Universidade de São Paulo

Faculdade de Saúde Publica

Efeito hipocolesterolemizante da proteína de amaranto (*Amaranthus cruentus* BRS-Alegria) em hamsters

Simone Mendonça

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

Área de Concentração: Nutrição
Orientador: Prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas

São Paulo
2006

Efeito hipocolesterolemizante da proteína de amaranto (*Amaranthus cruentus* BRS-Alegria) em hamsters

Simone Mendonça

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

Área de Concentração: Nutrição
Orientador: Prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas

São Paulo
2006

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores.

Assinatura:_____

Data: 04 de janeiro de 2006.

Dedico aos meus pais, Cleusa e José Nelson,
de quem recebi os exemplos de perseverança e o apoio
incondicional ao longo período de desenvolvimento deste trabalho.

“Rir muito e com freqüência,
ganhar o respeito das pessoas inteligentes
e o afeto das crianças,
merecer a consideração de críticos honestos
e suportar a traição de falsos amigos,
apreciar a beleza,
encontrar o melhor nos outros,
deixar o mundo um pouco melhor,
seja por uma saudável criança,
um canteiro de jardim ou uma redimida condição social,
saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque eu vivi.
Isso é ter tido sucesso!!”

(Ralph Waldo Emerson)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Alfredo G. Arêas, pela confiança plena que teve em meu potencial e pela imensa contribuição ao meu desenvolvimento intelectual.

À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), pela bolsa de estudo concedida.

Ao Prof. Dr. Paulo H. Saldiva que possibilitou a realização do experimento biológico, contribuindo com pessoal técnico, lâminas histológicas, trâmites burocráticos junto ao Hospital das Clínicas e Comitê de Ética. Estendendo o agradecimento, em especial, à Dra. Heloísa, por sua participação na obtenção, coletas e sacrifício dos animais.

Ao Prof. Dr. Carlos E. Corbett por colocar a disposição seu biotério para realização do experimento animal.

Ao biólogo Robison Cruz, por seu trabalho de coleta e sacrifício dos animais, e por sua contribuição na execução de um projeto dentro dos parâmetros éticos.

Às professoras Elisabeth Torres e Deborah Bastos pelas orientações, e por disponibilizar o uso de equipamentos de laboratório.

À Dra. Patrícia Sinnecker, por suas preciosas orientações, amizade e carinho.

A Jefferson Monteiro Gonçalves, pelo apoio fundamental no início do doutorado.

Às colegas de laboratório Andréa Guerra-Matias, Fernanda Granado, Rosana Manólio Soares, José Pereira, Rosa Nilda Chavez-Jauregui, Lílian Assis, pelo espírito de equipe e pela ajuda nos trabalhos de laboratório.

Às colegas de laboratório Thaís Campos Cardenas, Ana Carolina Conti e Silva, Áurea Juliana Bombo, Maria Clara Gaspar, Renee Leão Simbalista, Vanessa Capriles, Vitor Modesto Rosa, Suzana Camacho, Karoline Frota pelo constante incentivo e bons momentos.

As amigas Karina Dantas Coelho, Ana Carolina Moron Gagliardi, Jaqueline Meurer Siquinelli e Nadinei Perazza Ferres pela amizade dedicada e pelo auxílio na revisão do trabalho.

RESUMO

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

Objetivo. Amaranto é considerado um alimento funcional devido às suas propriedades de redução de colesterol plasmático. Um possível componente do amaranto responsável por este efeito é a proteína. **Métodos.** Neste estudo, foi produzido isolado protéico de amaranto através da solubilização da proteína em pH 11 e precipitação em pH 5,7, obtendo-se o isolado com pureza de 96% de proteína. Este isolado protéico foi utilizado como fonte de proteínas em dietas experimentais para hamsters que tiveram hipercolesterolemia induzida, previamente, por dieta contendo 30% de caseína e 0,05% de colesterol, durante 3 semanas. Os animais foram, então, distribuídos em três grupos (n=11 animais/grupo) e foram alimentados com dietas contendo: (A) 20% caseína (controle), (B) 20% proteína de amaranto purificada (grupo substituição) e (C) 20% caseína + 10% proteína de amaranto purificada (grupo suplementação). **Resultados.** Comparando-se com a dieta controle, o grupo da suplementação e o da substituição tiveram dramáticas reduções do nível de colesterol plasmático, 30% ($p<0,05$) e 51% ($p<0,05$) respectivamente, enquanto o controle apresentou redução de apenas 7% após os 28 dias de dieta. Já na primeira semana este comportamento de redução para as duas dietas contendo amaranto foi percebido, e a redução foi mais marcante na fração LDL. Os mecanismos envolvidos na redução do colesterol plasmático foram investigados. A digestibilidade verdadeira da proteína do amaranto foi igual à da caseína. A excreção de ácidos biliares foi inversamente proporcional à redução do colesterol plasmático nas diferentes dietas, enquanto que o colesterol excretado foi proporcional à redução do colesterol. Quando aminoácidos livres simulando o perfil da proteína de amaranto foram utilizados como única fonte de nitrogênio da dieta, a redução dos níveis de colesterol foi de 11%. A dieta contendo caseína e suplementada com arginina de forma a resultar numa relação lisina/arginina de 0,5 (a mesma observada na proteína de amaranto), mostrou-se deletéria aos parâmetros plasmáticos. **Conclusões.** Comprovou-se que a proteína de amaranto reduz o colesterol plasmático. A

digestibilidade e excreção de ácidos biliares não estão relacionados com a redução do colesterol provocada pela proteína do amaranto. A relação dos aminoácidos lisina/arginina explica apenas parcialmente o mecanismo e apenas a proteína íntegra tem efeito sobre a excreção de colesterol nas fezes. O mecanismo envolvido na redução do colesterol nestes experimentos ainda não está totalmente elucidado, sugerindo a necessidade de futuros estudos da ação direta de peptídeos formados pela digestão incompleta da proteína do amaranto no metabolismo lipídico.

Descritores: proteína, amaranto, colesterol, aminoácidos.

ABSTRACT

Mendonça S. **Cholesterol-lowering effect of amaranth protein (*Amaranthus cruentus* L. BRS-Alegria) in hamsters.** São Paulo (BR); 2006. (PhD Thesis – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Brazil).

Objective. Amaranth has been considered a functional food because its consumption can lower blood cholesterol levels. In the present work the effect of amaranth protein on this property was investigated in hamsters. A possible component in amaranth grain that would respond for this effect is the protein fraction. **Methods.** In this study the amaranth protein was isolated by its alkaline solubilization at pH 11 and acid precipitation at pH 5.7. The isolate thus produced was defatted and resulted in a protein content of about 96%. This product was introduced in experimental diets to fed hamsters that previously had their blood cholesterol increased by a diet containing 30% casein and 0.05% cholesterol during 3 weeks Animals were then, divided in 3 groups (n = 11/group) were fed diets containing (g/100 g diet): (A) 20 casein (control), (B) 20 purified amaranth's protein (group replacement), (C) 20 casein + 10 purified amaranth's protein (group supplementation) for 4 wks. **Results.** The results showed that when amaranth was the sole protein source (at 20% level) or it was admixed with casein (20% casein +10% of amaranth protein), the hypercholesterolemized hamsters had a significant ($P < 0.05$) reduction in cholesterol levels (51 and 30%, respectively) as compared 7% reduction of the control group (20% casein). In the first week of diet the decrease was already observed. The lowering was mainly in LDL fraction. The mecanisms involved in lowering plasma cholesterol were investigated. Digestibility of amaranth protein was as high. The bile acids excretion was inversely proportional to plasma cholesterol lowering, while cholesterol excretion in feces was directly proportional. When free amino acids simulating the amaranth protein were used as the only nitrogen source of diet the cholesterol reduction was about 11%. Casein supplemented with arginine to bring the lysine/arginine ratio to 0.5, as observed in amaranth protein, was had deleterious effects to hamsters' cholesterol levels. The bile acid and cholesterol excretion of this trial were equal to all groups. **Conclusions.** Amaranth´s protein reduces plasma cholesterol. Digestibility and bile acid excretion are not related to

hypocholesterolemic effect of amaranth's protein. The proportion between lysine/argine is a partial explanation for this effect, but the presence of whole protein is necessary for the higher cholesterol excretion in feces. The full understanding of mechanisms involved in cholesterol reduction in these experiments is not fully elucidated, suggesting further research on the direct action in lipid metabolism by peptides originated from the incomplete digestion of amaranth protein.

Descriptors: protein, amaranth, cholesterol, amino acids.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO ……..…….....1

2. REVISÃO DA LITERATURA …….....3

2.1. Amaranto.....3

2.1.1. Composição química e valor nutritivo…...….....…….....5

2.2. Produção de Isolado Protéico …….……..…...12

2.2.1. Aspectos Gerais…….....12

2.2.2. Isolamento da Proteína do Amaranto …….....…...16

2.3. Hipercolesterolemia…….....…....17

2.3.1. Caracterização …….....……....17

2.3.2. Papel da Dieta…….....…….....…....19

2.3.3. Efeito Hipocolesterolemizante do Amaranto……...……..…....22

2.4. Modelos Animais ….…….....25

3. OBJETIVOS…….....30

3.1. Objetivo Geral …….....30

3.2. Objetivos Específicos…….....30

4. MATERIAL E METODOLOGIA …….....……...…...…….....32

4.1. Matéria-Prima.....32

4.2. Teste de Granulometria…….....34

4.3. Produção de Isolado Protéico de Amaranto.....35

4.4. Caracterização da Matéria-Prima e do Isolado Protéico.....38

4.4.1. Composição Centesimal…….....38

4.4.2. Fibra Alimentar…….....39

4.4.3. Composição de Aminoácidos na Farinha e Isolado Protéico de Amaranto 39

4.4.4. Perfil de Ácidos Graxos na Farinha de Amaranto e Isolado Protéico 41

4.4.5. Presença de Esqualeno no Amaranto e Isolado Protéico de Amaranto.....42

4.4.6. Solubilidade de Proteínas.....42

4.4.7. Eletroforese…….....45

4.4.8. Extração Fracionada…….....46

4.5. Análises nas Rações.....….....……..47

4.5.1. Composição Centesimal…….....48

4.5.2. Perfil de Aminoácidos na Farinha e Isolado Protéico de Amaranto.49

4.5.3. Perfil de Ácidos Graxos 49

4.5.4. Colesterol.....49

4.6. Experimento Biológico.....50

4.6.1. Experimento Piloto.....52

4.6.2. Experimento Hipercolesterolemizante 56

4.6.3. Experimento Principal..... 56

4.6.4. Experimento Aminoácidos.....60

4.6.5. Análises no Plasma.....65

4.6.6. Coleta e Análises das Fezes dos Hamsters.....66

4.7. Análises Estatísticas.....71

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....72

5.1. Caracterização da Matéria-Prima.....72

5.1.1. Granulometria.....72

5.1.2. Composição Centesimal.....73

5.2. Produção do Isolado Protéico de Amaranto.....74

5.2.1. Tentativas de Produção em Escala Piloto.....74

5.2.2. Produção do Isolado Protéico em Escala Laboratorial.....81

5.3. Extração Fracionada.....89

5.4. Eletroforese da Farinha e do Isolado Integral e Desengordurado.....91

5.5. Perfil de Aminoácidos do Amaranto Integral e do Isolado Protéico de Amaranto Desengordurado.....93

5.6. Perfil de Ácidos Graxos e Esqualeno da Farinha de Amaranto e Isolado Protéico de Amaranto.....100

5.7. Composição das Rações Utilizadas no Experimento com

Animais.....105

5.7.1. Dieta Experimento Piloto….....…….....105

5.7.2. Dieta Experimento Principal e Experimento Aminoácidos.....106

5.8. Resultados do Experimento Piloto……...……....110

5.9. Experimento Hipercolesterolemizante em Fêmeas.....119

5.10. É Possível Comparar os Resultados dos Machos e das Fêmeas?...122

5.11. Experimento Biológico Principal.....124

5.11.1. Consumo de Dieta e Peso dos Animais.....124

5.11.2. Peso do Fígado.....126

5.11.3. Perfil Lipídico.....127

5.11.4. Correlação entre as Variáveis Plasmáticas e Consumo.....145

5.11.5. Digestibilidade Verdadeira.....145

5.11.6. Teores de Ácidos Biliares e Colesterol nas Fezes.....147

5.12. Experimento Aminoácidos.....151

5.12.1. Consumo de Dieta e Peso dos Animais.....151

5.12.2. Peso do Fígado.....153

5.12.3. Perfil Lipídico.....154

5.12.4. Correlação entre Variáveis Plasmáticas e de Consumo.....162

5.12.5. Análises nas Fezes.....163

5.13. Discussão sobre Possíveis Mecanismos.....164

6. CONCLUSÕES.....170

7. LITERATURA CITADA.....172

ANEXOS

ANEXO 1 - Parecer do comitê de ética em pesquisa A-1

ANEXO 2 - P-valores dos testes para comparar as médias dos níveis plasmáticos do experimento Principal após as dietas.....A-2

ANEXO 3 – Intervalo de confiança (90%) e p-valores das comparações múltiplas de Bonferroni para a diferença de médias (linha-coluna) dos níveis plasmáticos do experimento Principal na coleta basal, após a dieta Hipercolesterolemizante e após **uma semana** de consumo de cada dieta experimental.....A-3

ANEXO 4 – Intervalo de confiança (90%) e p-valores das comparações múltiplas de Bonferroni para a diferença de médias (linha-coluna) dos níveis plasmáticos do experimento Principal na coleta basal, após a dieta Hipercolesterolemizante e após **quatro semanas** de consumo de cada dieta experimental.....A-4

ANEXO 5 – P-valores dos testes para comparar as médias dos níveis plasmáticos do experimento Principal após uma semana e quatro semanas de consumo de cada dieta experimental e intervalos de confiança (90%) de Bonferroni para a diferença das médias (4ªsemana – 1ªsemana).....A-5

ANEXO 6 – Intervalos de confiança (90%) e p-valores das comparações múltiplas de Bonferroni para a diferença de médias (linha-coluna) das digestibilidades das dietas consumidas no experimento Principal.....A-6

ANEXO 7 - Correlação de Pearson e significância entre as variáveis plasmáticas, peso e consumo dos machos após dieta Hipercolesterolemizante.....A-7

ANEXO 8 - Correlação de Pearson e significância entre as variáveis plasmáticas, peso e consumo dos machos após dieta Controle.....A-8

ANEXO 9 - Correlação de Pearson e significância entre as variáveis plasmáticas, peso e consumo dos machos após dieta Amaranto+Caseína.....A-9

ANEXO 10 - Correlação de Pearson e significância entre as variáveis plasmáticas, peso e consumo dos machos após dieta Amaranto.....A-10

ANEXO 11 – P-valores dos testes para comparar as médias dos níveis plasmáticos do experimento Aminoácidos após as dietas.....A-11

ANEXO 12 – Intervalo de confiança (90%) e p-valores das comparações múltiplas de Bonferroni para a diferença de médias (linha-coluna) dos níveis plasmáticos do experimento Aminoácido na coleta basal, após a dieta Hipercolesterolemizante e após **uma semana** de consumo de cada dieta experimental.....A-12

ANEXO 13 – Intervalo de confiança (90%) e p-valores das comparações múltiplas de Bonferroni para a diferença de médias (linha-coluna) dos níveis plasmáticos do experimento Aminoacido na coleta basal, após a dieta Hipercolesterolemizante e após **quatro semanas** de consumo de cada dieta experimental.....A-13

ANEXO 14 – P-valores dos testes para comparar as médias dos níveis plasmáticos do experimento Aminoácido após uma semana e quatro semanas de consumo de cada dieta experimental e intervalos de confiança (90%) de Bonferroni para a diferença das médias (4ªsemana – 1ªsemana).....A-14

ANEXO 15 - Correlação de Pearson e significância entre as variáveis plasmáticas, peso e consumo das fêmeas após dieta Hipercolesterolemizante.....A-15

ANEXO 16 - Correlação de Pearson e significância entre as variáveis plasmáticas, peso e consumo das fêmeas após dieta Controle.....A-16

ANEXO 17 - Correlação de Pearson e significância entre as variáveis plasmáticas, peso e consumo das fêmeas após dieta Caseína+Arginina.....A-17

ANEXO 18 - Correlação de Pearson e significância entre as variáveis plasmáticas, peso e consumo das fêmeas após dieta Aminoácidos da Caseína.....A-18

ANEXO 19 - Correlação de Pearson e significância entre as variáveis plasmáticas, peso e consumo das fêmeas após dieta Aminoácidos do Amaranto.....A-19

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 Composição centesimal do grão de amaranto.....6

Tabela 2.2 Composição de aminoácidos do grão de amaranto (g/100g) e soja (g/100g), e padrão de aminoácidos essenciais de acordo com a FAO/WHO.....9

Tabela 4.1 Soluções-tampão utilizadas na construção de curva de pH para teste de solubilidade de proteína da farinha de amaranto.....43

Tabela 4.2 Composição das rações utilizadas no experimento Piloto (dados apresentados em g do componente/100g de ração).....55

Tabela 4.3 Composição de ácidos graxos nos óleos utilizados e da mistura obtida pela proporção indicada de cada um dos 3 óleos.....55

Tabela 4.4. Ingredientes utilizados na fabricação das rações utilizadas no experimento Principal (g do ingrediente/100g de ração).....60

Tabela 4.5 Ingredientes utilizados na fabricação das rações utilizadas no experimento aminoácidos (g do ingrediente/100g de ração).....62

Tabela 4.6 Mistura de aminoácidos que visava simular o perfil de aminoácidos presentes na isolado protéico de amaranto e da caseína (g do /100g de mistura).....63

Tabela 5.1 Granulometria da farinha de amaranto desengordurada.....72

Tabela 5.2 Composição centesimal (base seca) do amaranto (*Amaranthus cruentus* BRS-Alegria) e farinha de amaranto desengordurada.....73

Tabela 5.3 Eficiência da extração e teor de proteína no isolado protéico nos diferentes pH´s testados para a obtenção de isolado protéico de amaranto ….....84

Tabela 5.4 Distribuição de pesos moleculares obtidos pela eletroforese do amaranto e dos seus isolados protéicos produzidos no pH 4,7 e 5,7.....86

Tabela 5.5 Porcentagem de lipídeos extraídos por diferentes métodos/solventes empregados no desengorduramento do isolado protéico de amaranto.....87

Tabela 5.6 Alteração da composição centesimal (base seca) do amaranto durante a produção do isolado protéico de amaranto desengordurado.....89

Tabela 5.7 Extração fracionada da farinha de amaranto integral e desengordurada (g proteína/100g de amostra).....91

Tabela 5.8 Distribuição de Pesos Moleculares (kDa) na farinha de amaranto integral e desengordurada, e no isolado protéico de amaranto integral e desengordurado.....92

Tabela 5.9 Perfil de aminoácidos do amaranto integral e do isolado protéico de amaranto desengordurado com álcool etílico, analisados pelo ITAL e Labtec. Dados são apresentados em g de aminoácido/100g de amostra.....94

Tabela 5.10 Perfil de aminoácidos do amaranto integral, isolado protéico de amaranto desengorduradado e recomendações de aminoácidos essenciais da FAO/WHO (1991). Dados são apresentados em g de aminoácido/100g de proteína.....99

Tabela 5.11 Principais ácidos graxos do amaranto BRS-Alegria (com e sem o ácido erúcico) e dados de literatura (valores expressos em porcentagem).....101

Tabela 5.12 Composição (base seca) de rações utilizadas no experimento Piloto, representado em g/100g de ração.....105

Tabela 5.13 Perfil de ácidos graxos das rações utilizadas no experimento Piloto (valores expressos em %).....106

Tabela 5.14 Composição (base seca) de rações utilizadas no experimento Principal, representado em g/100g de ração.....106

Tabela 5.15 **P**erfil dos principais ácidos graxos das rações utilizadas no experimento Principal (valores expressos em %).....107

Tabela 5.16 Composição (base seca) de rações utilizadas no experimento aminoácidos, representado em g/100g de ração.....107

Tabela 5.17 Perfil dos principais ácidos graxos das rações utilizadas no experimento aminoácidos (valores expressos em %).....108

Tabela 5.18 Perfil de aminoácidos das rações aminoácidos do amaranto e aminoácidos da caseína. Dados são apresentados em g de aminoácido/100g de proteína.....109

Tabela 5.19 Teor de proteína de dietas (base úmida*)* utilizadas nos experimentos Piloto, Principal e Aminoácidos representado em g/100g de dieta.....110

Tabela 5.20 Consumo diário de ração e consumo total nas 3 semanas, ganho de peso e coeficiente de eficácia alimentar para hamsters alimentados com diferentes dietas no experimento Piloto (após 3 semanas).....111

Tabela 5.21 Consumo diário de ração e consumo total nas 5 semanas, ganho de peso e coeficiente de eficácia alimentar para hamsters alimentados com diferentes dietas no experimento Piloto (após 5 semanas).....111

Tabela 5.22 Perfil lipídico plasmático dos hamsters do ensaio Piloto.....113

Tabela 5.23 Consumo e peso do fígado para os animais mantidos por diferentes tempos na dieta hipercolesterolmizante no experimento Hipercolesterolemizante em Fêmeas.....119

Tabela 5.24 Perfil lipídico plasmático dos hamsters do ensaio experimento Hipercolesterolemizante em Fêmeas.....120

Tabela 5.25 Comparação de médias das variáveis plasmáticos de machos e fêmeas antes do início das dietas experimentais (basal), após 3 semanas de consumo da dieta hipercolesterolemizante e 4 semanas de consumo da dieta controle, e seus respectivos p-valores da análise de variância (ANOVA).....123

Tabela 5.26 Ingestão de ração diária, ganho de peso e coeficiente de eficácia alimentar para hamsters alimentados com diferentes dietas no experimento Principal.....125

Tabela 5.27 Peso do fígado dos hamsters do experimento Principal.....126

Tabela 5.28 Peso das fezes e teor de ácidos biliares e colesterol nas fezes dos hamsters do experimento Principal.....148

Tabela 5.29 Ingestão de ração diária, ganho de peso e coeficiente de eficácia alimentar para hamsters alimentados com diferentes dietas no experimento Aminoácidos.....152

Tabela 5.30 Peso do fígado dos hamsters do experimento aminoácidos.....153

Tabela 5.31 Peso das fezes e teor de ácidos biliares nas fezes dos hamsters do experimento Aminoácidos.....163

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Corte transversal e longitudinal da semente de amaranto. (Fonte: FAO).....16

Figura 4.1. Fluxograma de processamento da matéria-prima.....33

Figura 4.2. Fluxograma da produção do isolado protéico de amaranto.....37

Figura 4.3. Fluxograma representando o desenho experimental do ensaio Piloto…54

Figura 4.4. Fluxograma do experimento Principal.....58

Figura 4.5. Fluxograma do experimento Aminoácidos…….64

Figura 4.6 Gaiolas especiais para coleta de fezes, no detalhe, a tela de aço inox com fezes retidas. 68

Figura 5.1 Ilustração de centrífuga de fluxo contínuo similar à utilizada. 75

Figura 5.2 Equipamento de ultracentrifugação QuixStand da Amersham Biosciences.....78

Figura 5.3 Fluxograma do processo de ultrafiltração acompanhado das principais determinações de teor de proteína.....80

Figura 5.4. Curva de solubilidade de proteína (% de nitrogênio) de amaranto desengordurado em diferentes valores de pH, determinado pelo método de Bradford..83

Figura 5.5. Gel de Eletroforese 10% SDS-PAGE de Amaranto. 1º perfil : farinha de amaranto integral, 2º perfil: isolado protéico de amaranto isolado a pH 5,7, 3º perfil: isolado protéico de amaranto isolado a pH 4,7, 4º perfil: mistura de padrões de peso molecular.....85

Figura 5.6. Gel de Eletroforese 10% SDS-PAGE de Amaranto. 1º , 6º e 7º perfil: mistura padrão de peso molecular, 2º perfil: farinha de amaranto integral, 3ºperfil:

farinha de amaranto desengordurada, 4º perfil: isolado protéico de amaranto, 5º perfil: isolado protéico de amaranto desengordurado.....92

Figura 5.7 Cromatogramas das análises de ácidos graxos: padrão e amaranto. No cromatograma do amaranto os principais ácidos graxos apontados, estão representados nos picos: 4 (palmítico), 5(esteárico), 6 (oléico), 8 (linoléico), 9 (γ-Linolênico), 10 (α-Linolênico), 11 (erúcico ou esqualeno?).....103

Figura 5.8. Cromatograma das análises de esqualeno: padrão e amaranto.....104

Figura 5.9. Concentração de triglicérides no plasma de hamsters do experimento Piloto.....115

Figura 5.10. Concentração de colesterol total no plasma de hamsters do experimento Piloto.....115

Figura 5.11. Concentração de HDL-Colesterol no plasma de hamsters do experimento Piloto.....116

Figura 5.12. Concentração de Colesterol não-HDL no plasma de hamsters do experimento Piloto.....116

Figura 5.13. Distribuição do colesterol nas diferentes frações de lipoproteínas de acordo com a dieta e dia de coleta, em hamsters do experimento Piloto (Cas: ração caseína; Col: ração colesterol; Sat: ração saturados; 3s: coleta na 3ª semana; 5s: coleta na 5ª semana).....117

Figura 5.14. Distribuição do colesterol nas diferentes lipoproteínas nos animais sacrificados no decorrer do experimento Hipercolesterolemizante em Fêmeas (os números assinalados nas barras referem-se aos valores colesterol expressos em mg/dL da respectiva fração lipoprotéica)…….....121

Figura 5.15. Concentração de triglicérides no plasma de hamsters nos diferentes momentos (0 Dias: após adaptação dos animais ao biotério; 21 Dias: após 3 semanas de dieta hipercolesterolemizante; 26 dias: após 5 dias das dietas

experimentais; 49 Dias: após 28 dias das dietas experimentais) do experimento Principal.....128

Figura 5.16. Concentração de colesterol total no plasma de hamsters nos diferentes momentos (0 Dias: após adaptação dos animais ao biotério; 21 Dias: após 3 semanas de dieta hipercolesterolemizante; 26 dias: após 5 dias das dietas experimentais; 49 Dias: após 28 dias das dietas experimentais) do experimento Principal.....129

Figura 5.17. Concentração de HDL-Colesterol no plasma de hamsters nos diferentes momentos (0 Dias: após adaptação dos animais ao biotério; 21 Dias: após 3 semanas de dieta hipercolesterolemizante; 26 dias: após 5 dias das dietas experimentais; 49 Dias: após 28 dias das dietas experimentais) do experimento Principal.....130

Figura 5.18. Concentração de LDL-Colesterol no plasma de hamsters nos diferentes momentos (0 Dias: após adaptação dos animais ao biotério; 21 Dias: após 3 semanas de dieta hipercolesterolemizante; 26 dias: após 5 dias das dietas experimentais; 49 Dias: após 28 dias das dietas experimentais) do experimento Principal.....131

Figura 5.19. Concentração de VLDL-Colesterol no plasma de hamsters nos diferentes momentos (0 Dias: após adaptação dos animais ao biotério; 21 Dias: após 3 semanas de dieta hipercolesterolemizante; 26 dias: após 5 dias das dietas experimentais; 49 Dias: após 28 dias das dietas experimentais) do experimento Principal.....132

Figura 5.20. Representação conjunta da concentração de VLDL-Colesterol e LDL-Colesterol, como Colesterol não-HDL no plasma de hamsters nos diferentes momentos (0 Dias: após adaptação dos animais ao biotério; 21 Dias: após 3 semanas de dieta hipercolesterolemizante; 26 dias: após 5 dias das dietas experimentais; 49 Dias: após 28 dias das dietas experimentais) do experimento Principal.....133

Figura 5.21. Representação dos resultados estatísticos para análise de colesterol total nas diferentes dietas na primeira e quarta semana do experimento Principal.....134

Figura 5.22. Representação dos resultados estatísticos para análise de HDL-Colesterol nas diferentes dietas na primeira e quarta semana do experimento Principal.....137

Figura 5.23. Representação dos resultados estatísticos para análise de Colesterol não-HDL nas diferentes dietas na primeira e quarta semana do experimento Principal. 137

Figura 5.24. Distribuição do colesterol nas diferentes lipoproteínas dos animais do experimento Principal, de acordo com a dieta e momento da coleta (os números assinalados nas barras referem-se aos valores colesterol expressos em mg/dL da respectiva fração lipoprotéica).....141

Figura 5.25. Representação gráfica da Digestibilidade Verdadeira (%) da proteína presente nas diferentes rações utilizadas no experimento Principal.....……..146

Figura 5.26. Representação gráfica do colesterol e ácidos biliares excretados nas fezes de animais do experimento Principal.....148

Figura 5.27. Representação gráfica da concentração de triglicérides no plasma de hamsters diferentes momentos (0 Dias: após adaptação dos animais ao biotério; 21 Dias: após 3 semanas de dieta hipercolesterolemizante; 26 dias: após 5 dias das dietas experimentais; 49 Dias: após 28 dias das dietas experimentais) do experimento Aminoácidos.....155

Figura 5.28. Representação gráfica da concentração de colesterol total no plasma de hamsters diferentes momentos (0 Dias: após adaptação dos animais ao biotério; 21 Dias: após 3 semanas de dieta hipercolesterolemizante; 26 dias: após 5 dias das dietas experimentais; 49 Dias: após 28 dias das dietas experimentais) do experimento Aminoácidos.....156

Figura 5.29. Representação gráfica da concentração de HDL-Colesterol no plasma de hamsters diferentes momentos (0 Dias: após adaptação dos animais ao biotério;

21 Dias: após 3 semanas de dieta hipercolesterolemizante; 26 dias: após 5 dias das dietas experimentais; 49 Dias: após 28 dias das dietas experimentais) do experimento Aminoácidos.....157

Figura 5.30. Representação gráfica do Colesterol não-HDL (VLDL-c + LDL-c) no plasma de hamsters nos diferentes momentos (0 Dias: após adaptação dos animais ao biotério; 21 Dias: após 3 semanas de dieta hipercolesterolemizante; 26 dias: após 5 dias das dietas experimentais; 49 Dias: após 28 dias das dietas experimentais) do experimento Aminoácidos.....158

Figura 5.31. Distribuição do colesterol nas diferentes lipoproteínas dos animais do experimento Aminoácidos, de acordo com a dieta e momento da coleta (os números assinalados nas barras referem-se aos valores colesterol expressos em mg/dL da respectiva fração lipoprotéica).....161

LISTA DE SIGLAS

Ácido Clorídrico.....HCl

Arginina……Arg

Cholesteryl Ester Transfer Protein (Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol)…… ……..……...……CETP

Cisteína.....Cys

Cloreto de Sódio.....NaCl

Coeficiente de Eficácia Alimentar .....CEA

Colesterol Total.....CT

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....CLAE

Dieta Aminoácidos da Caseína.....AA CAS

Dieta Aminoácidos do Amaranto…….AA AM

Dieta Caseína + Amaranto.....CAS+AM

Dieta Caseína + Arginina.....CAS+ARG

Dieta com Isolado Protéico de Amaranto.....AM

Dieta Hipercolesterolemizante.....HIPER

Dodecil Sulfato de Sódio .....SDS

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida .....PAGE

Fenilalanina.....Phe

Food and Drug Administration.....FAO

Fração de Alto Peso Molecular.....HMF

Hidróxido de Sódio .....NaOH

Hidroximetil Glutaril Coenzima A.....HMG-CoA

Instituto de Tecnologia de Alimentos……ITAL

Isolado Protéico de Amaranto Desengordurado .....IPA Des

Isolado Protéico de Amaranto.....IPA

Lipoproteína de Alta Densidade .....HDL

Lipoproteína de Baixa Densidade .....LDL

Lipoproteína de Muito Baixa Densidade.....VLDL

Lisina.....Lys

Metionina.....Met

National Cholesterol Education Program.....NCEP

Nitrogênio Não-Protéico.....NNP

p-Dimetilamino Benzaldeído…….DAB

Protein Efficiency Ratio (Coeficiente de Eficiência Protéica).....PER

Quilodalton.....kDa

Tampão Hidroximetil aminometano.....TRIS

Triglicérides.....TG

Valor Nominal de Peso Molecular de Corte.....NMWC

1. INTRODUÇÃO

A cultura do Amaranto (*Amaranthus cruentus* L. variedade BRS-Alegria) vem sendo introduzida no Brasil por sua ótima qualidade nutricional (alto teor de proteína e de melhor valor biológico que a de cereais) e funcional, além de características agronômicas de adaptabilidade (SPHEAR *et al*. 2003).

O Brasil tem percebido o impacto da adoção de uma dieta de países industrializados e as doenças coronarianas, que são altamente correlacionadas com estilo de vida, têm sido a maior causa de morte no país (MAGALHÃES *et al.* 2004). A coexistência de desnutrição e obesidade num mesmo indivíduo não é rara e o amaranto mostra potencial de aplicação em ambas as situações.

Algumas investigações mais recentes demonstraram que o amaranto, quando ingerido em quantidade significativa, é um alimento hipocolesterolemizante (BERGER *et al.* 2003ab; CHATUVERDI *et al*. 1993; GRAJETA 1997; PLATE e ARÊAS 2002). Estes trabalhos sugerem várias hipóteses para justificar este efeito, como o perfil de aminoácidos de sua proteína, seu teor de fibras totais e solúveis, e proporção de ácidos graxos insaturados. Outras investigações voltam-se para a possibilidade da presença de fitoquímicos, substâncias biologicamente ativas, como o tocotrienóis e tocoferóis, esqualeno, entre outros (DANZ e LUPTON 1992, QURESHI *et al.* 1996). Poucas pesquisas foram feitas em busca da caracterização do componente que exerce maior impacto sobre os níveis séricos de colesterol. PLATE e ARÊAS (2002) demonstraram que a fração lipídica desempenha um papel menos

importante na redução do colesterol sérico e os componentes do grão livres de lipídeos e demais substâncias lipossolúveis eram suficientes para responder pelo efeito hipocolesterolemizante.

A fração protéica é um possível componente do amaranto responsável por este efeito e uma possível causa é a sua proporção de aminoácidos lisina/arginina de maneira similar ao observado para a proteína de soja. O mecanismo pelo qual esta proporção produziria o efeito observado ainda na foi elucidado, mas apontam para algum tipo de reconhecimento por enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal de mamíferos gerando peptídeos com esta ação biológica. Outro mecanismo ligado à menor digestibilidade desta proteína de origem vegetal é a geração de frações que complexam ácidos biliares e colesterol, que a faria agir no intestino de maneira similar à fibra alimentar.

O presente trabalho se propõe a investigar o efeito da proteína isolada de amaranto, livre dos demais componentes potencialmente hipocolesterolemizantes (lipídeos, tocotrienóis e esqualeno), no perfil lipídico de hamsters que tiveram hipercolesterolemia induzida através da dieta.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Amaranto

O amaranto (*Amaranthus* sp.) é um pseudocereal da classe das dicotiledôneas. É uma planta anual, cultivada principalmente na região dos Andes, desde a época dos Incas. Atualmente vem sendo cultivado no México, na América Central e nos territórios andinos da América do Sul (KALINOWSKI 1986; NATIONAL RESEARCH COUNCIL 1989). No Brasil, há um projeto da Embrapa Cerrados para introdução do amaranto como cultivo secundário, em regiões de plantio de soja (SPEHAR *et al.* 1998).

A produção agrícola do amaranto foi importante desde 8000 a 4000 a.C., de acordo com estudos arqueológicos conduzidos no Peru, México e Estados Unidos. A civilização Maia provavelmente foi a primeira a usá-lo como um grão de cultura extensiva. Também as civilizações Asteca e Inca o utilizavam como um grão de consumo diário, e tal era a importância do grão que foi incorporado em cerimônias religiosas. Antes da colonização espanhola, os Astecas chegaram a produzir 15 a 20 toneladas por ano. Devido à associação do amaranto com rituais pagãos, os conquistadores espanhóis proibiram sua produção e uso, ação que explica porque hoje em dia é tão pouco consumido (BRESSANI 1989).

O interesse mundial pelo amaranto é muito recente. A partir dos anos 80 surgem as primeiras investigações, lideradas pela Academia Nacional de Ciências

dos Estados Unidos e, praticamente, se produziu um redescobrimento do cultivo, justificado, principalmente, por seu valor nutritivo e potencial agronômico (MONTEROS *et al.* 1998).

Devido a um grande número de características agronômicas que a fazem uma planta resistente a condições climáticas mais drásticas e à sua alta capacidade de uso eficiente da água, seu cultivo também se presta como planta forrageira (BRESSANI 1989).

As espécies mais estudadas e cultivadas são: o *A. cruentus* (México, África, Caribe, Ásia e América do Sul), *A. caudatus* (América do Sul), *A. hypochondriacus* (Índia, México e Estados Unidos) e *A. tricolor* (China e Índia) (BREENE 1991; SAUNDERS e BECKER 1984).

O *A. cruentus* é cultivado no México como um cultivo secundário na região central, onde é utilizado na confecção de bolachas chamadas de "alegria", feitas com o amaranto estourado como pipoca. Esta espécie é também cultivada no norte da Índia, sudeste asiático e Manchúria (IRVING *et al.* 1981).

O aproveitamento da planta é integral, sendo que a vantagem nutricional das folhas é a presença de carotenóides, vitamina C, ferro e proteína de boa qualidade e a do grão um aporte energético, um bom teor de fibra e sua proteína de boa qualidade nutricional (BERGANZA *et al.* 2003).

Quanto ao grão, seu consumo mais comum é na forma expandida, como pipoca. Mas também pode ser consumido na forma de extrusado (CHAVEZ-

JAUREGUI e ARÊAS 2000), cozido, tostado, em flocos (BRESSANI *et al.* 1991), e incorporado em massas e biscoitos (BRENNER e WILLIANS 1995).

Todos estes atributos têm contribuído para crescente interesse em trazer esta planta para o cultivo comercial (BRESSANI 1989). O *A. cruentus* BRS-Alegria originou-se de uma linhagem procedente dos Estados Unidos, adaptada ao solo brasileiro pela Embrapa Cerrados a partir de 1998. Tem rendimento médio de 2.359 kg por hectare, sendo colhida 90 dias após o plantio (SPEHAR *et al.* 2003).

2.1.1 Composição química e valor nutritivo

Além de apresentar alto teor de fibras solúveis (4,2g/100g) em comparação com outros cereais como o trigo (2,3g/100g), milho (2,0g/100g) e aveia (1,9g/100g) (EARLY e EARLY 1987), o amaranto tem valores relativamente elevados de proteína, de 13,2 a 18,2% (BECKER *et al.* 1981; GORINSTEIN *et al.* 2001), e possui alta qualidade protéica devido ao seu teor de aminoácidos essenciais, principalmente com relação à lisina que é um aminoácido limitante em outros grãos (TEUTONICO e KNORR 1985; BRESSANI 1989). Um exemplo da composição centesimal do amaranto é apresentado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Composição centesimal do grão de amaranto.

Componentes	Porcentagem (%)
Umidade	9,4
Proteínas (N x 6,25)	14,5
Açúcares solúveis	2,7
Amido	64,8
Lipídios	7,2
Fibras	8,4
Cinzas	3,2

Fonte: KALINOWSKI (1982).

2.1.1.1 Proteína

O teor de proteína do amaranto varia de 13,2 a 18,2% (BECKER *et al.* 1981) e é, em média, superior aos encontrados em cereais como trigo (13,5-14,5%), milho (10,6-13,8%), cevada (10-14,9%) e aveia (12,4-12,9%) (GORISNTEIN *et al.* 2001).

É consenso que proteínas de origem animal são significativamente superiores às de origem vegetal do ponto de vista nutricional. A diferença está na maior biodisponibilidade daquelas proteínas e no perfil de aminoácidos essenciais que satisfazem mais eficientemente as necessidades humanas. No entanto, há algumas exceções, como a soja, milho de alta qualidade protéica, quinoa e amaranto, que apresentam uma proteína vegetal com qualidades bem próximas da de origem animal (BRESSANI 1989).

O PER (Protein Efficiency Ratio) é um índice de qualidade da proteína, calculado pela divisão do peso ganho pelo animal pela quantidade de proteína ingerida (DUTRA-DE-OLIVEIRA e MARCHINI 2000). Para o amaranto foram relatados valores de PER que variam de 1,5 a 2,0 (para um valor de 2,5 para a caseína) (YANEZ *et al.* 1994) e, especificamente, para o *A. cruentus* foi relatado 2,3 (GARCIA *et al.* 1987).

As principais proteínas de reserva de cereais (trigo, cevada, milho e sorgo) são as prolaminas álcool-solúveis, no entanto a aveia e o arroz têm as globulinas e glutelinas, respectivamente, como suas principais proteínas de reserva (GORINSTEIN *et al*. 1991). As dicotiledôneas, como a soja, por sua vez, apresentam como principais proteínas de reserva as globulinas e albuminas (DRZEWIECKI *et al.* 2003). O amaranto, assim como soja, apresenta as globulinas como sua principal forma de proteína de estocagem (GORINSTEIN *et al.* 2002). A fração gliadina do trigo, uma prolamina, é responsável pelas reações alérgicas relacionadas à doença celíaca. Este componente não é encontrado no amaranto, o que o faz apropriado para dietas que devem ser isentas de glúten (NAKAMURA 1987; GORINSTEIN *et al.* 2002). Fato confirmado por MATUZ *et al.* (2000) que relataram que o amaranto não reage no teste usando anticorpos policlonais anti-gliadina (trigo) produzidos em coelhos.

A composição de aminoácidos da globulina do amaranto é quase a mesma que a da globulina da soja e da aveia (KONISHI *et al.* 1985; GORINSTEIN *et al.* 1991) e apresentam similar distribuição de peso molecular das subunidades de globulina 11S purificada (MARCONE 1999).

BRESSANI e GARCIA-VELA (1990) avaliando as três espécies mais difundidas de amaranto (*caudatus, hypochondriacus* e *cruentus*) concluíram que a fração globulina é predominante no grão, sendo 41% do total, seguida da glutelina (31%), prolamina (10%) e albumina (8.4%). No entanto, se a ordem de extração for invertida, sendo a água o primeiro solvente, ao invés de solução de cloreto de sódio, a fração albumina passa a ser em média 20% das proteínas, enquanto que a globulina passa a ser 19%. Como esta metodologia de extração permite que uma fração esteja contaminando outra, é mais adequado que albumina e globulina sejam representadas juntas. Assim, a soma da fração albumina e globulina, obtidas pelo método de OSBORNE (1924), mais o nitrogênio não protéico no amaranto gira em torno de 50%. Com o emprego de outras metodologias, outros valores podem ser encontrados, como os descritos por DUARTE-CORREA *et al.* (1986) que, usando uma complexa técnica de fracionamento, encontrou a seguinte distribuição: 65% de albumina, 17% de globulina, 11% de prolamina e 7% de glutelina.

Revisando 11 trabalhos que avaliaram o perfil de aminoácidos de amarantos de diferentes espécies, BRESSANI (1989) relatou que o perfil de aminoácidos é similar entre as diferentes espécies. Em relação à sua qualidade, quando comparado às recomendações da FAO, o aminoácido mais deficiente é a leucina, embora esta deficiência não atinja valores abaixo de 80% (IMERI *et al*. 1987a) e não tenha sido comprovada em ensaios biológicos (IMERI *et al*. 1987b). No entanto, é rico em lisina, triptofano e aminoácidos sulfurados. Os cereais geralmente são pobres em lisina, sendo que o milho, além disso, é pobre em triptofano, e o arroz e trigo em treonina. O alto teor de metionina e cisteína do amaranto o faz um bom

complemento para as leguminosas, que têm estes aminoácidos como limitantes (BRESSANI 1989).

O teor de lisina do amaranto é o dobro do trigo e três vezes o presente no milho (ZHLEZNOV *et al.* 1997). Por outro lado, o teor de proteína e a composição de aminoácidos dependem do genótipo e condições de cultivo (GORINSTEIN *et al.* 2002).

Tabela 2.2 - Composição de aminoácidos do grão de amaranto (g/100g), soja (g/100g) e padrão de aminoácidos essenciais de acordo com a FAO/WHO.

Aminoácido	Amaranthus caudatus (1)	Amaranto cruentus (2)	Amaranthus hypochondriacus (3)	Proteína de Soja (3)	**Padrão FAO/WHO (4)**
Arginina	9,3	10,5	4,3	2,6	--
Lisina	6,5	7,4	2,3	1,7	5,8
Histidina	2,9	4,7	2,6	3,3	1,9
Isoleucina	4,0	3,1	6,0	7,7	2,8
Leucina	5,9	6,0	10,6	14,0	6,6
Cisteína	3,5	Nd	Nd	Nd	**
Metionina	3,4	3,0	3,4	0,7	2,5**
Fenilalanina	4,6	5,3	9,1	19,1	***
Tirosina	2,8	4,9	1,2	3,3	6,3***
Treonina	3,2	3,9	3,0	3,6	3,4
Triptofano	Nd	1,4	Nd	Nd	1,1
Valina	4,9	5,4	6,3	7,7	3,5
Glicina	8,1	9,9	16,0	8,5	--

(1) Chavez-Jáuregui *et al.* (2000) e Weigartner (1987); (2) Bressani e Garcia-Vela (1990); (3) Gorinstein *et al.* (2001); (4) Recomendação para Idade Pré-Escolar por FAO/WHO 1991.
(Met+Cys) *(Phe+Tyr)
Nd: dado não disponível

2.1.1.2 Fração Lipídica

O teor de óleo no amaranto fica entre de 1,9 a 8,7%, e varia conforme a espécie e genótipo. É um teor elevado se comparado aos cereais, mas ainda bastante inferior ao das oleaginosas (24-48%) (HE e CORKE 2003). O *A. cruentus* tem um teor relativamente alto de óleo em relação às outras espécies de amaranto, em média 6,7%.

Os ácidos graxos presentes em maiores quantidades no amaranto são o palmítico (19%), oléico (26%) e linoléico (47%). O ácido graxo essencial linolênico está presente na proporção de 1,4% dos ácidos graxos totais (BERGER *et al* 2003a).

Embora o óleo de amaranto tenha perfil de ácidos graxos similar à maioria dos cereais, o que o difere é seu alto teor de hidrocarboneto altamente insaturado, o esqualeno (BECKER 1989).

A maioria dos óleos vegetais contém quantidades muito pequenas de esqualeno. O óleo de oliva, um dos que apresenta os maiores níveis, contém aproximadamente 0,41 a 0,54%. Este composto é encontrado em grande quantidade em óleo de fígado de animais marinhos, estando presente na concentração de 30 a 45% do óleo. No entanto, seu uso tem sido limitado devido às dificuldades em obtê-lo destas fontes e devido à preocupação internacional na preservação de espécies marinhas (HE e CORKE 2003).

O esqualeno é aplicado como lubrificante de instrumentos eletrônicos finos e em cosméticos (BERGANZA *et al.* 2003). Além disso, tem sido relatado

como tendo importantes efeitos benéficos na saúde, como na diminuição de risco de câncer (SMITH 2000) e na redução de colesterol sérico (MIETTINEM e VANHANEN 1994).

O óleo da semente de amaranto contém de 2,4 a 8,0% de esqualeno (BRUNI *et al.* 2001; LEON-CAMACHO *et al.* 2001), sendo que no *A. cruentus* o mesmo corresponde a 0,43% do peso total do grão.

Berger *et al.* (2003a) relatam que 9,3% da fração lipídica é composta por insaponificáveis, sendo que 6,8% correspondem ao esqualeno. Além disso, 2,7% da gordura são compostas por fitoesteróis. As quantidades de tocoferóis e tocotrienóis foram consideradas mínimas.

2.1.1.3 Amido

O amido é o componente predominante do amaranto, consistindo de 48 a 62% do grão, e é composto quase que 100% por amilopectina (BECKER *et al.* 1981; SAUNDERS e BECKER 1984) e está presente na forma de pequenos grânulos de 1-3 μm de diâmetro, com forma poligonal, estando entre os menores encontrados na natureza (STONE e LORENZ 1984).

2.1.1.4 Fibra Alimentar

Entre os alimentos integrais, as leguminosas e os cereais, aveia e cevada, contêm um equilíbrio entre fibras solúveis e insolúveis. Os cereais apresentam alto teor de fibras insolúveis e baixo de solúveis, enquanto as frutas apresentam maior proporção de fibras solúveis (HUGHES 1991).

O amaranto é considerado excelente fonte de fibras insolúveis, compostas principalmente por celulose e lignina, com teores superiores ao encontrado em cereais (BECKER e SAUNDERS 1984).

CARDOZO e EITENMILLER (1988) citam que o amaranto apresenta teor de 8,1% de fibra insolúvel e 1,8% de solúvel. FERREIRA (1999) encontrou 5,0% de fibra insolúvel e 3,3 % de fibra solúvel. MARCÍLIO *et al.* (2003) avaliando o *A. cruentus* produzido no Brasil relata 4,2% de fibra alimentar.

2.2 Produção de Isolado Protéico

2.2.1 Aspectos Gerais

Na produção industrial de isolados protéicos, a proteína é recuperada a partir da extração no material bruto em solvente adequado (usualmente aquoso) com

a intenção de concentrar a proteína no produto final. Baseado no tipo de proteína presente no material, a mesma pode ser extraída melhor em água (albumina), solução salina (globulina), etanol 70-80% (prolamina) ou com solução fortemente alcalina/ácida (glutelina).

No entanto, antes da extração da proteína, o material que contém alto teor de óleo deve ser desengordurado. Isto evita a formação de emulsão durante o processo de extração de proteína. Compressão mecânica (SHRESTHA *et al.* 2002), assim como uso de solventes como hexano (ABBOTT *et al.* 1991) e éter de petróleo (SATHE *et al*. 2002) geralmente são utilizados para a remoção da gordura. A retirada de lipídeos livres ou fracamente ligados à estrutura protéica, utilizando n-hexano como solvente orgânico, provoca pequenos aumentos, cerca de 15%, na quantidade de proteína que pode ser solubilizada (BACCHI e BATISTUTI 1994).

Outra vantagem do desengorduramento consiste na retirada de certos componentes indesejáveis. Sementes, geralmente, contêm altos teores de fitato, compostos fenólicos e outros fitoquímicos que podem interferir no isolamento ou não serem desejados no produto final (ALUKO 2004). Fitatos podem ser removidos com solução aquosa de metanol (80%), como aplicado na semente de girassol (GONZALEZ-PEREZ *et al.* 2002). BLAICHER *et al.* (1983) produziram um isolado protéico de colza com baixo teor de fitato, após extração em pH 4,0. O processo de isolamento protéico consiste na solubilização da proteína em uma solução aquosa fortemente alcalina, descartando-se o material insolúvel na primeira centrifugação. O sobrenadante sofre então, um ajuste de pH com solução de ácido clorídrico para um pH próximo ao ponto isoelétrico das proteínas em questão. Deixa-se em repouso para

que as proteínas se agreguem e precipitem e nova centrifugação é realizada, separando-se a maior parte da proteína neste precipitado (ALUKO, 2004). Após esta purificação, a proteína obtida é referida como concentrado protéico ou isolado protéico, sendo no mínimo 65% e 90%, respectivamente, a concentração protéica (UZZAN 1988).

Uma outra forma de concentrar a proteína presente no extrato após a primeira centrifugação em meio alcalino (que mantém a proteína no sobrenadante), seria submetê-la ao processo de ultrafiltração (UF), esta técnica tem sido aplicada com sucesso na fabricação de isolado protéico a partir de sementes (DIOSADY *et al* 1984; HAMADA, 2000; MOURE *et al.* 2001; TZENG *et al.* 1990; XU *et al.* 2003). Durante a ultrafiltração, a água e pequenas moléculas, como glucosinolatos, fitatos e fenólicos, passam seletivamente através da membrana, enquanto as moléculas maiores, como as protéicas, permanecem no líquido retido e, após várias passagens, é concentrada. Dependendo do tamanho do poro e natureza da membrana empregada, algumas proteínas podem ser perdidas no filtrado (TZENG *et al.* 1990).

O processo mais utilizado industrialmente na preparação de isolados protéicos envolve a precipitação isoelétrica (ERICKSON 1995; GUEGUEN 1983) que é utilizado pela indústria nacional na produção de isolados protéicos de soja (Bunge Alimentos, Brasil). Durante a precipitação, as proteínas solúveis são convertidas em insolúveis pela alteração de sua estrutura (características de superfície) ou mudanças no meio (RAPHAEL 1997). Isso leva a uma supersaturação da solução que, por sua vez, resulta em nucleação seguida por agregação. Diversos ácidos fortes, como HCl, H_2SO_4 e H_3PO_4 têm sido usados para a precipitação

isoelétrica (BELL *et al.* 1983). No ponto isoelétrico, a solubilidade é mínima porque as interações do tipo dipolo-dipolo e eletrostáticas entre moléculas de proteína vizinhas aumentam, fazendo com que as moléculas atraiam-se (RAPHAEL, 1997). Depois da precipitação a proteína pode ser recuperada por meio de centrifugação, decantação ou filtração. Além da mudança do pH da solução para o ponto isoelétrico, proteínas podem ser também precipitadas usando o calor (>45°C), sais neutros [NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, Na_3PO_4, $NaSO_4$ e K_2SO_4], íons metálicos (Ca^{2+}, Ba^{2+} e Zn^{2+}), polieletrólitos e solventes orgânicos (etanol, acetona e éter) (BELL *et al.* 1983).

A ultrafiltração preserva as propriedades nativas das proteínas em maior extensão do que a precipitação (FUHRMEISTER e MEUSER 2003), porque não são empregados reagentes químicos que poderiam resultar na desnaturação protéica. Além disso, a ultrafiltração não precisa ser seguida por diálise, necessária para remover sais e outras substancias utilizadas ou formadas durante a precipitação.

Após a ultrafiltração ou precipitação a proteína é geralmente seca através de *spray drying* ou liofilização.

A composição da proteína pode ser alterada durante a extração e concentração quando comparada à originalmente presente no grão. Isto pode resultar em um perfil de aminoácidos diferente no produto final, o que, por sua vez, pode afetar a funcionalidade e qualidade nutricional da proteína recuperada (TZENG *et al.* 1988).

2.2.2 Isolamento da Proteína do Amaranto

Usando técnicas de fracionamento anatômico, assim como moagem controlada do *A. cruentus*, BETSCHART *et al.* (1981) verificaram que 65% da proteína estão localizadas no germe e casca, sendo que o endosperma contém apenas 35% da proteína. Esta distribuição é o oposto do que ocorre em cereais como milho, sorgo e arroz, que apresentam mais de 80% da sua proteína localizada no endosperma. BRESSANI (1989) sugere que esta distribuição explica o maior teor de proteína do amaranto e sua maior riqueza em aminoácidos essenciais.

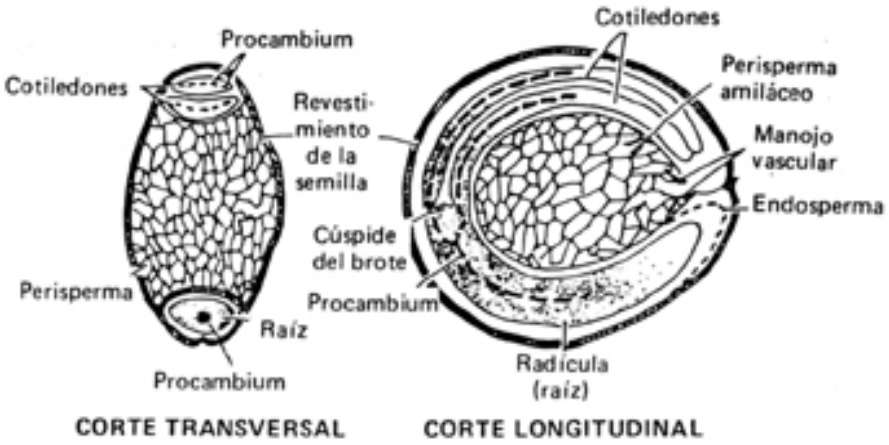


Figura 2.1. Corte transversal e longitudinal da semente de amaranto. (Fonte: FAO*[1]).

---

*1- Referenciado em: <URL: http://www.fao.org/Regional/LAmerica/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/ contenido/libro10/cap03_1_2.htm> [2005 Outubro 30].

Seria uma estratégia interessante o isolamento do germe para obterem-se produtos de alto teor protéico. No entanto, devido ao pequeno tamanho da semente (aproximadamente 1mg/semente) e a forma como o germe se deposita como um anel envolvendo o endosperma o processamento seria muito difícil (BRESSANI 1989).

Alguns autores já estudaram este processamento aplicado ao amaranto. PAREDES-LÓPEZ *et al.* (1988) estabeleceram que o melhor rendimento possível para produção de isolado protéico de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) ocorre quando se emprega pH 11 para extração e pH entre 4,5 e 5,0 para precipitação. SALCEDO-CHAVEZ *et al.* (2002) sugerem pH 9,2 para extração e pH de 5,7 para a precipitação da proteína de amaranto (*Amaranthus cruentus*) na produção de isolado protéico. MARTINEZ e ANON (1996) relatam um ótimo de extração em pH 9,0 e de precipitação em pH 5,0.

2.3 Hipercolesterolemia

2.3.1 Caracterização

Numerosos estudos experimentais, epidemiológicos, ensaios clínicos e metanálises estabeleceram claramente a associação entre dislipidemia e aumento do risco de morte. A elevação dos níveis plasmáticos de colesterol de baixa densidade (LDL-C), a redução dos níveis de colesterol de alta densidade (HDL-C) e também o

aumento de triglicérides (TG) são fatores de risco para eventos cardiovasculares, sendo esta a principal causa de morte no mundo (MAGALHÃES *et al.* 2004). O Brasil acompanha este fenômeno internacional, apresentando estatísticas onde as principais causas de morte são as doenças cardiovasculares, com valores percentuais em torno de 25%, responsáveis por cerca de 250.000 mortes ao ano (MANSUR *et al*. 2001, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Grande parte do colesterol circulante é sintetizada no próprio organismo a partir de ácidos graxos; sendo que aproximadamente 1/3 é proveniente da dieta (STIPANUK, 2000). O controle da concentração sérica do colesterol ocorre principalmente através da regulação da captação das LDL's, que é umas das principais transportadoras do colesterol endógeno. O aumento da quantidade de LDL`s (que pode ser monitorado pela dosagem da sua proteína, a apoB-100), bem como o aumento da quantidade de colesterol que as mesmas carregam, representam igualmente um quadro de risco para a gênese da aterosclerose (DIETSCHY, 1997). Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e na progressão da aterosclerose continuam incertos. Nos últimos anos, várias evidências experimentais têm mostrado que a modificação oxidativa da LDL e de outras lipoproteínas é uma etapa crucial na patogênese da aterosclerose (ESTERBAUER *et al.*, 1992, WITZUM e STEINBERG, 1991,).

Por outro lado, em humanos, altas concentrações de colesterol em HDL (lipoproteína de alta densidade) e uma baixa relação LDL/HDL podem significar proteção contra doenças cardiovasculares (CASTELLI *et al.*, 1992).

No entanto, é preciso atentar para o papel da HDL em cada espécie animal antes de interpretar resultados relativos à dieta em experimentos animais, uma vez que em algumas espécies o HDL não é responsável apenas pelo transporte reverso do colesterol, como em humanos. Ratos transportam mais de 50% do colesterol circulante nas HDL's, já o coelho, de modo mais próximo ao observado em humanos, transporta apenas 10 a 15% (BRATTSAND 1976 *apud* PLATE e ARÊAS, 2002).

As dislipidemias são distúrbios metabólicos que afetam os níveis das lipoproteínas circulantes. Quando neste quadro está aumentado o nível sérico de colesterol pode-se dizer que o indivíduo tem uma hipercolesterolemia. As dislipidemias podem estar associadas a fatores genéticos ou ambientais, como tabagismo, sedentarismo, dieta incorreta e abuso do álcool. Se for resultante de ações medicamentosas ou for conseqüência de alguma doença de base (diabetes, insuficiência renal, etc.), são consideradas dislipidemias secundárias (QUINTÃO, 1996).

2.3.2 Papel da Dieta

As mais recentes recomendações do National Cholesterol Education Program (NCEP 2002) sobre as modificações da dieta, se tornaram ainda mais exigentes que as anteriormente adotadas (NCEP 1987); sendo adotada a ingestão

diária máxima de 7% das calorias na forma de ácidos graxos saturados (anteriormente era de 10%) e de menos de 200 mg de colesterol (anteriormente era de 300 mg). Além disso, passa a recomendar o consumo de fibra alimentar solúvel (10-25 mg/dia) e de fitoesteróis (2 mg/dia) como agentes redutores de LDL-C, principal alvo da terapia redutora de riscos cardiovasculares.

Embora o colesterol da dieta não represente um fator considerável do nível plasmático de colesterol, devido aos mecanismos de controle de sua síntese, vários outros componentes da dieta podem colaborar para o controle desse nível (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 1998).

Vários componentes da dieta têm sido relacionados a um efeito hipolipemiante (ou especificamente hipocolesterolemizante), como as fibras solúveis (em especial a β-glucana presente na fibra de aveia), o perfil dos ácidos graxos (mono e poliinsaturados), as várias substâncias com efeito antioxidante oriundas de vegetais (isoflavonas da soja, fitoesterois, tocotrienóis, alicina, etc.), e proteínas de origem vegetal (BIDLACK 2000; MAHAN e ESCOTT-STUMP 1998).

A ação da proteína de vegetais na diminuição do colesterol em ratos, hamsters e coelhos, vem sendo relatada na literatura e, mais recentemente, testes em humanos substituindo proteína animal por proteína de soja, têm alcançado valores significativos de redução de lipídeos plasmáticos. No entanto, o mecanismo deste efeito é ainda controverso.

Diversos trabalhos investigaram os efeitos de diferentes fontes protéicas no perfil lipídico de animais experimentais. A maioria deles encontrou um efeito hipocolesterolemizante das proteínas de soja quando comparado com a caseína do

leite (ANDERSON *et al.* 1995; AOYAMA *et al.* 2000; CARROLL e KUROWSKA 1995; MADANI *et al.* 2000; NAGATA *et al.* 1982; SARWAR e RATNAYAKE, 2000).

As diferentes fontes de proteína afetam principalmente a quantidade de lipoproteínas presentes no plasma, mais do que o teor de colesterol total. A proteína de soja quando comparada à caseína diminui os níveis de LDL e VLDL (Very Low Density Lipoprotein) (MAHAN e SCOTT-STUMP, 1998).

CAROLL e KUROWSKA (1995); SUGANO, ISHWAK e NAKASHIMA (1984) e outros autores, atribuem o efeito à seqüência de aminoácidos.

Existem evidências que os efeitos hipocolesterolêmicos estão correlacionados com as diferenças no perfil de aminoácidos entre a proteína de soja e caseína. As indicações são de que as proporções metionina/glicina e lisina/arginina sejam determinantes da aterogenicidade e altos níveis de colesterol, respectivamente, e que maiores concentrações de arginina e de glicina agem como fatores protetores (GIROUX *et al.* 1999; SARWAR e RATNAYAKE 2000;). A ausência completa de metionina não é benéfica, uma vez que os aminoácidos sulfurados são essenciais, e necessários para síntese de glutationa (MOUNDRAS *et al.* 1995).

Estudos em que uma mistura de aminoácidos reproduzia a composição da proteína de soja não alcançaram os mesmos efeitos nos níveis de colesterol dos animais, sugerindo que algum outro componente não-protéico estaria presente nos isolados de soja parcialmente purificados (HUFF *et al.* 1977; NAGATA *et al.* 1982; TASKER e PORTER 1993). MADANI *et al.* (2000) prepararam um isolado protéico

de soja altamente purificado, e não obtiveram diminuição na colesterolemia total em ratos, embora algumas alterações quanto ao número de partículas LDL e HDL tenham sido observadas.

Os benefícios de substâncias biologicamente ativas, lipossolúveis, como os que fitoestrógenos proporcionam ao sistema cardiovascular já foram bem estabelecidos. Segundo TERPSTRA *et al.* (1984) os fitoestrógenos reduzem os títulos de LDL e a taxa de colesterol sanguíneo em animais e em humanos. A soja é naturalmente rica em um grupo de compostos coletivamente chamados de fitoestrógenos isoflavônicos ou isoflavonas. Métodos tradicionais de produção de isolado de soja resultam em preparações protéicas relativamente puras, que contém baixos teores de isoflavonóides (LUSAS e RIAZ 1995), enquanto que métodos para produção de proteína texturizada de soja costumam reter isoflavonóides (ANDERSON e WOLF 1995).

Portanto, não é consenso que a proteína de soja, isenta de outros componentes fitoquímicos, seja responsável pelo efeito hipocolesterolemizante (ANDERSON *et al.* 1995).

2.3.3 Efeito Hipocolesterolemizante do Amaranto

CHATUVERDI *et al* (1993) demonstraram que a dieta contendo amaranto reduziu em mais 50% o colesterol total de ratos em relação à dieta controle,

e levantaram a hipótese de que esta ação esteja ligada ao seu perfil de ácidos graxos, rico em insaturados.

Estudos de DANZ e LUPTON (1992) relatam que o amaranto produz efeito redutor nos níveis de lipídeos séricos, embora menos pronunciado do que o da aveia. Ele apresenta um alto nível de esqualeno, razão pela qual, segundo os autores, tem-se pensando que este reduz o nível de lipídeos através da inibição da HMG-CoA redutase, enzima presente no fígado e que regula a biossíntese de colesterol. QURESHI *et al.* (1996) também sugeriram a presença de um potente inibidor da enzima HMG-CoA redutase no amaranto, além de 8 isômeros da vitamina E (enfatizando o desmetil-tocotrienol). LEHMANN (1996) relata que a hipocolesterolemia estaria associada a algum componente solúvel na fração lipídica do amaranto, sugerindo serem os tocotrienóis e esqualeno. O esqualeno tem efeitos variáveis em hamsters (SMITH *et al.* 2000) e humanos (GYLLING e MIETTINEN 1994; STRANDBERG *et al* 1990) podendo explicar os efeitos observados do amaranto.

A hipótese de que a composição de ácidos graxos do óleo de amaranto (rica em insaturados) (CHAVEZ-JAUREGUI *et al.*, 2000) semelhante à do óleo de girassol, fosse a principal responsável pelo efeito hipocolesterolemizante não foi confirmada por PLATE e ARÊAS (2002) ao demonstrarem que o óleo de amaranto não foi tão eficiente quanto extrusados de amaranto obtidos a partir de farinha desengordurada de amaranto, na diminuição dos níveis de colesterol total e colesterol LDL em coelhos. Em um experimento com ratos, foi demonstrado que o amaranto

integral e o amaranto desengordurado tinham capacidade similar na redução de colesterol plasmático (GRAJETA 1997).

BERGER *et al.* (2003a) estudando o óleo e grão de amaranto em hamsters, relatam que houve diminuição do colesterol total e não houve diferença significativa no teor de LDL-C em ambos os tratamentos, com relação ao controle. Foram considerados como possíveis agentes hipocolesterolemizantes os fitoesteróis e a proteína do amaranto, descartando a possibilidade de que o perfil de ácidos graxos, esqualeno, tocoferóis e tocotrienóis serem os constituintes relevantes para este efeito.

OKITA e SUGANO (1981) e WEST *et al.* (1984) atribuíram o efeito hipocolesterolemizante da proteína de soja à estrutura terciária e secundária da globulina, e de acordo com MARCONE (1999) o amaranto e a soja apresentam similaridade de distribuição de pesos moleculares das subunidades globulinas 11S.

Segundo VAHOUNY *et al.* (1985) e RATNAYAKE, SARWAR e FARHEY (1997), o efeito hipocolesterolemizante da proteína de soja deve-se à proporção lisina/arginina, que é 0,9. A proteína de amaranto apresenta proporção similar, que é de 0,8, e a caseína tem proporção 2,50 (KAYASHITA *et al.* 1995).

Uma outra possibilidade associada ao efeito hipocolesterolemizante nos estudos com a proteína de soja é de que esta seja menos digerível que a caseína. Isto faria com que a proteína estivesse simulando os efeitos da fibra alimentar, levando a redução da absorção de colesterol da dieta e interferindo na reabsorção de ácidos biliares que se ligariam às frações indigeríveis, sendo eliminados nas fezes. KAYASHITA *et al.* (1997) sugeriram que o efeito hipocolesterolemizante da proteína de trigo era devido a este mecanismo, por observarem um aumento da

excreção fecal de esteróis neutros em ratos. O *Amaranthus caudatus* tem um índice de digestibilidade protéica que varia entre 76 a 85%, dependendo da variedade genética estudada, ao passo que a caseína tem uma digestibilidade protéica de 93% (IMERI *et al.* 1987). Portanto, uma maior excreção de esteróis neutros e sais biliares nas fezes pela ação da fração indigerível da proteína é um possível mecanismo para o efeito hipocolesterolemizante observada no amaranto.

Como mencionado, há uma vasta literatura no estudo dos efeitos funcionais da soja, seja quanto à sua proteína ou quanto aos seus compostos fitoquímicos. Há mais de 80 anos esse alimento tem sido testado em animais e nas últimas duas décadas tornaram-se mais intensivos os testes em humanos (GRUNDY *et al.* 1983; ANDERSON J *et al.* 1995). Estes estudos podem servir de parâmetro para a fundamentação dos estudos das propriedades funcionais das proteínas do amaranto.

2.4 Modelos Animais

O propósito de usar modelos animais na pesquisa biomédica reside na tentativa de correlacionar os fenômenos biológicos entre as espécies. Ou seja, desejamos examinar sistemas de um animal em determinadas situações, e poder extrapolar as observações para uma outra espécie, principalmente para humanos.

Porém, é preciso reconhecer as limitações destas extrapolações. O metabolismo lipídico, por exemplo, apresenta diferenças muito marcantes nas diferentes espécies. Os humanos carregam a maior parte do colesterol circulante no plasma na forma de lipoproteínas de baixa densidade ou de muito baixa densidade (VLDL+LDL) e estas frações estão usualmente presentes em maior quantidade em indivíduos hipercolesterolêmicos. Por sua vez, a maior parte dos animais carrega o colesterol plasmático predominantemente através da proteína de alta densidade (HDL). Por esta razão, o rato, por exemplo, não é um modelo adequado para estudar os efeitos da dieta no perfil lipídico (KOWALA *et al.* 1991).

O coelho é um dos modelos experimentais mais utilizados no estudo da aterosclerose, pois tem o metabolismo de lipídeos bastante semelhante ao do homem e rapidamente desenvolve hipercolesterolemia por dieta (BROUSSEAU e HOEG 1999; VAHOUNY *et al.* 1985), sendo adequado para o estudo do impacto da proteína no metabolismo lipídico. No entanto, é um animal que demanda quantidades relativamente altas de dieta e espaço, quando comparado a outros modelos experimentais.

O hamster é um animal que vem sendo bastante utilizado em estudos de efeito de drogas e dieta no metabolismo de lipídeos e aterosclerose, desde a década de 80 (NISTOR *et al.* 1987; SPADY *et al*. 1993). De modo semelhante ao coelho, o perfil de lipoproteínas do hamster parece-se mais com o dos humanos do que o de ratos ou camundongos (BRAVO *et al.* 1994; SUCKLING *et al.* 1991; WOOLETT *et al.* 1989), sendo a LDL a principal carreadora de colesterol plasmático, com 50% do colesterol plasmática transportado por esta fração. Além disso, apresentam receptor

de LDL e a proteína carreadora de ésteres de colesterol e triglicérides, a CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein). Características estas que não estão presentes em ratos e camundongos convencionais (NISTOR *et al.* 1987).

Alguns autores (KOWALA *et al.* 1991; NICOLOSI *et al.* 1998; TERPSTRA *et al* 1991*)* sugerem que a indução de hipercolesterolemia em hamster pode ser feita com adição de quantidades fisiológicas de colesterol à dieta (0,05 a 0,1% colesterol em peso). DORFMAN *et al.* (2003) relatam que 1% do colesterol adicionado à dieta de hamsters foi hepatotóxico, interferindo no metabolismo de lipoproteínas e limitando a relevância do entendimento da fisiopatologia da aterosclerose. Além disso, sugerem que a melhor condição de indução de hipercolesterolemia seria a adição de 0,1% de colesterol ou 10% de gordura saturada na dieta.

KOWALA *apud* ROBINS *et al.* (1995) afirma que hamsters são suscetíveis a hiperlipemia com quantidades relativamente modestas de gordura saturada e colesterol. Em estudos em hamsters DIETSCHY *et al.* (1993) afirmam que para notar os diferentes efeitos do perfil dos ácidos graxos nos teores plasmáticos de LDL-C, é necessária a presença de colesterol na dieta. A ação dos ácidos graxos saturados se dá na inibição dos receptores de LDL (NICOLOSI *et al.* 1997).

No entanto, BERGER *et al.* (2003a) sugerem que o uso de dieta rica em ácidos graxos saturados (14% óleo de coco) e em colesterol (0,12%) na indução de hipercolesterolemia em hamsters, impede a observação do efeito dos componentes do amaranto na fração LDL, já que o excesso destes componentes inibe completamente os receptores de LDL.

Portanto, o ideal seria induzir a hipercolesterolemia sem empregar teores tão altos de colesterol ou ácidos graxos, a ponto do efeito da fonte protéica não pudesse ser observado. Em alguns trabalhos a hipercolesterolemia foi induzida em coelhos, usando exclusivamente o excesso de caseína (CARROL *et al.* 1975; PLATE e ARÊAS 2002).

Em coelhos alimentados com dieta rica em colesterol (0,2%) há um aumento mais pronunciado (8,3 mmol/L) da colesterolemia do que quando alimentados somente com caseína (3,22 mmol/L), e de forma mais rápida 07 dias, contra 14 ou mais dias com caseína. Nos animais alimentados com caseína o acúmulo de LDL no plasma deve-se à diminuição no *clearance*, ao passo que nos animais alimentados com altos teores de colesterol esta fração é aumentada por aumento da produção de lipoproteínas ricas em colesterol, principalmente de β-VLDL, sem aumento compensatório da formação de ácidos biliares. Os receptores ficam saturados e o seu número fica diminuído (BEYNEN *et al.* 1983).

Estudos do impacto da fonte de proteína nos níveis plasmáticos de colesterol têm conclusões divergentes quanto à necessidade da presença do colesterol na dieta. Em humanos a presença de colesterol na dieta parece acentuar o efeito da fonte protéica, ao passo que em espécies como ratos, suínos e macacos sem a presença de colesterol a diferença não é observada. TERPSTRA *et al.* (1991) obtiveram uma diferença significativa na colesterolemia de hamsters alimentados com uma dieta contendo 25% de caseína ou proteína de soja, na presença ou na ausência de colesterol, embora a diferença na colesterolemia dos animais fosse muito mais acentuada na presença de colesterol.

Em experimentos em que galinhas, outro modelo animal bastante empregado, foram alimentadas com colesterol, não houve diferença no impacto no colesterol sérico da fonte protéica. No entanto, quando a hipercolesterolemia foi induzida por colesterol, o alto teor de proteína, bloqueou o efeito do colesterol na hipercolesterolemia, independentemente da fonte protéica ser caseína ou proteína de soja (TERPSTRA *et al.* 1981).

Em resumo, não está claro que a dieta rica em caseína e isenta de colesterol, seja capaz de induzir hipercolesterolemia em hamsters da mesma forma que o faria em coelhos. Por isso, estudos pilotos devem ser realizados com o emprego de potenciais indutores de hipercolesterolemia, como colesterol, caseína e ácidos graxos saturados.

3. OBJETIVOS:

3.1.Objetivo Geral

Estudar o impacto da proteína isolada de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. variedade BRS-alegria) nos níveis plasmáticos de colesterol de hamsters que tiveram hipercolesterolemia induzida por dieta.

3.2.Objetivos Específicos:

3.2.1. Isolar a proteína de amaranto de maneira a obter bom rendimento e, ao mesmo tempo, não alterar a proporção entre frações protéicas ou aminoácidos presentes.

3.2.2. Caracterizar a proteína de amaranto, estabelecendo um fator de conversão nitrogênio-proteína e relação lisina/arginina para o amaranto produzido no Brasil.

3.2.3. Testar a capacidade da caseína na elevação do colesterol sérico na presença de pequenas quantidades de colesterol.

3.2.4. Avaliar o impacto da proteína na hipercolesterolemia em hamsters em função de sua digestibilidade e perfil de aminoácidos.

3.2.5. Verificar se a adição da proteína de amaranto à dieta é capaz de reduzir o colesterol mesmo em presença de caseína.

4. MATERIAL E METODOLOGIA

4.1. Matéria-Prima

O amaranto (*Amaranthus cruentus* L. variedade BRS-alegria) foi obtido já beneficiado em março de 2003, proveniente da Embrapa Cerrados (Planaltina - DF). Após recebimento foi moído em moinho de martelos (modelo MML-100 Astecma - Brasil), com peneira interna média (1,0 mm de diâmetro ou tyler 16).

A seguir, a farinha obtida foi desengordurada em bombonas plásticas, sendo que para cada 7 kg de farinha de amaranto foram utilizados 35 litros de hexano (grau analítico), segundo recomendações de MARTINEZ e ANON (1996). Esta mistura foi agitada por 4 horas com auxílio de uma haste com hélice acoplada a um motor (marca Kohlbach, Brasil) com velocidade de 1730 rpm. Ao final deste período, a mistura foi decantada, e o sobrenadante coletado para posterior recuperação. A farinha desengordurada ainda impregnada de solvente que ficou no fundo da bombona foi vertida em papel de filtro e o solvente residual foi evaporado em capela, em temperatura ambiente por 24 horas. A seguir, para garantir uma farinha totalmente livre de hexano, a amostra foi seca em estufa com circulação de ar por 24 horas, à temperatura de 40 a 45°C, sendo regularmente revolvida para secagem homogênea do material. O material foi tamisado em tamis com 0,420mm de abertura e os materiais retidos foram homogeneizados em gral e, novamente, submetidos à secagem.

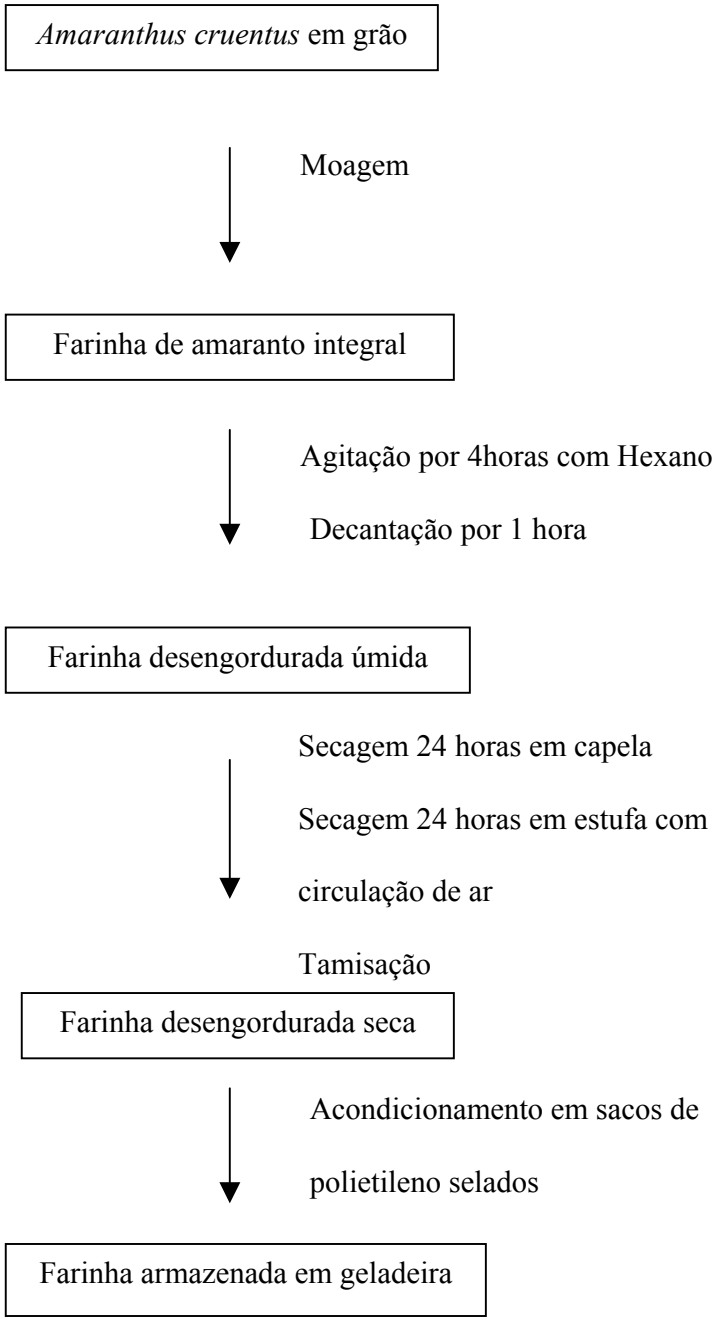


Figura 4.1. Fluxograma do processamento da matéria-prima.

A farinha desengordurada seca foi acondicionada em sacos de polietileno, que foram selados e mantidos em geladeira (temperatura 5 a 10°C) até sua utilização. O fluxograma desta etapa do processamento está representado na Figura 4.1. Foram assim processados, 92 quilos de amaranto, obtendo ao final 80 quilos de farinha desengordurada.

4.2 Teste de Granulometria

Um conjunto de tamises (Tyler 20, 35, 60, 80, 100) foi adaptado ao equipamento de agitação ERWEKA AR400 (Apparatebau GmbH, Alemanha). Cem gramas de farinha foram colocadas no tamis superior da pilha de tamises, que foi tampado, e a seguir o conjunto foi agitado sob velocidade constante por 20 minutos. Ao final deste tempo, a quantidade de farinha retida em cada um dos tamises foi pesada em balança analítica.

4.3 Produção do Isolado Protéico de Amaranto

A produção do isolado protéico de amaranto baseia-se em precipitação isoelétrica da proteína. Alguns autores já estudaram este processamento aplicado ao amaranto. PAREDES-LÓPEZ *et al.* (1988) estabeleceram que o melhor rendimento possível para produção de isolado protéico de amaranto (*Amaranthus hypocondriacus*) ocorre quando se emprega pH 11 para extração e pH entre 4,5 e 5,0 para precipitação. SALCEDO-CHAVEZ *et al.* (2002) sugerem pH 9,2 para extração e pH de 5,7 para a precipitação da proteína de amaranto (*Amaranthus cruentus*) na produção de isolado protéico. Similarmente MARTINEZ e ANON (1996) relatam um ótimo de extração em pH 9,0 e de precipitação em pH 5,0.

No entanto, ainda não havia sido padronizada uma técnica de produção de isolado protéico de amaranto com o cultivar produzido no Brasil. Alguns testes no laboratório serviram para ajustar as condições de extração. As condições que foram testadas e se mostraram mais eficiente na extração foram: proporção amostra: solvente extrator de 1:10, a agitação horizontal por tempo prolongado (*overnight*). Além disso, o uso de filtros de papel (Whatmann número 4 ou 11) não afetou a pureza do isolado obtido, portanto a filtração da mistura de extração foi realizada com gaze. A eficiência da extração foi testada através da análise da matéria seca e teor de proteína do sobrenadante determinados de acordo com métodos 44-40 e 46-30 da AACC, respectivamente (AACC 2000). O rendimento da extração foi expresso como porcentagem de proteína extraída em relação a proteína presente originalmente na farinha desengordurada.

As considerações sobre as condições testadas em nosso laboratório, com relação ao pH de extração e precipitação estão relatadas no item 5.2.2.2 com o fim de obter o produto de maior pureza e rendimento, e os parâmetros de processamento selecionados e empregados neste trabalho estão ilustradas na Figura 4.2.

O isolado protéico foi mantido congelado (-20°C) e então enviado para liofilização na unidade Semi-Industrial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

O isolado protéico liofilizado foi então triturado e desengordurado novamente. Vários solventes foram testados para determinação de qual deles seria capaz de extrair maior quantidade de fração apolar, pois tanto ácidos graxos quanto componentes da fração insaponificável não são desejáveis no isolado, uma vez que se pretende estudar a ação da proteína totalmente livre de outros componentes potencialmente hipocolesterolemizantes. Por isso, éter etílico, álcool etílico e hexano foram testados na extração à quente em Soxhlet para verificação de qual extrairia maior quantidade de fração apolar.

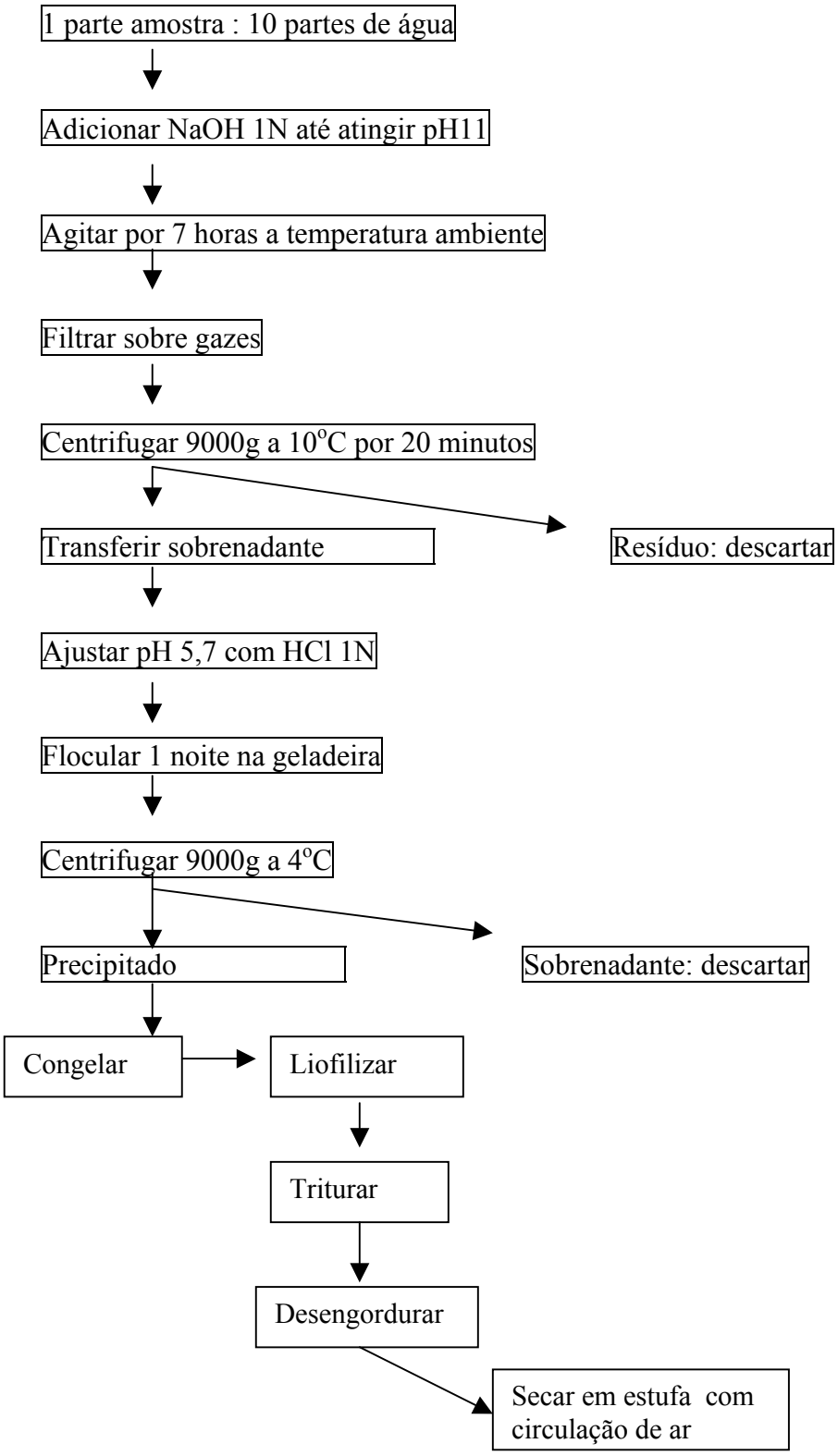


Figura 4.2. Fluxograma da produção do isolado protéico de amaranto desengordurado.

4.4 Caracterização da Matéria-Prima e do Isolado Protéico

4.4.1. Composição Centesimal

As análises de umidade, cinzas, extrato etéreo e proteínas da farinha de amaranto integral e desengordurada, foram realizadas de acordo com metodologia da AOAC (1990). O teor de carboidratos foi calculado por diferença.

Para conversão de nitrogênio em proteína (micro-Kjeldahl) utilizou-se o fator 5,30 para a farinha de amaranto e 6,12 para isolado protéico de amaranto. Estes valores foram calculados a partir da soma da massa de aminoácidos (mg) obtidos por cromatografia de troca iônica dividido pelo teor de nitrogênio (mg) da amostra (SOSULSKI e IMAFIDON 1990), conforme detalhado no item 5.5 de resultados.

A quantificação de extrato etéreo foi realizada em equipamento tipo Soxhlet (modelo MA 486/3 Marconi; Piracicaba, Brasil), de acordo com recomendações do fabricante, utilizando como extrator o éter etílico.

4.4.2. Fibra Alimentar

A determinação de fibra solúvel e insolúvel foi realizada de acordo com método enzimo-gravimétrico de PROSKY *et al.* (1988).

4.4.3. Composição de Aminoácidos na Farinha e Isolado Protéico de Amaranto

A composição de aminoácidos da farinha de amaranto integral foi determinada por cromatografia de troca iônica e reação pós-coluna com ninidrina. A técnica é baseada na hidrólise da proteína (tomada de amostra que contenha o equivalente a 25 mg de proteína) em meio ácido (10 mL de HCl 6N, sob vácuo, à temperatura de 110°C por 22 horas). Posteriormente, os aminoácidos hidrolisados são recuperados em tampão citrato de pH 2,2 (marca Pickering). Uma alíquota de 25 μL foi injetada no analisador Dionex DX 300 para separação dos aminoácidos em coluna de troca iônica e reação pós-coluna com ninidrina. O produto dessa reação foi quantificado em um colorímetro e registrado sob a forma de pico. As áreas dos picos obtidos a partir das amostras desconhecidas foram comparadas a de uma mistura padrão de aminoácidos, usando-se como referência solução padrão de aminoácidos Pierce (SPACKMAN *et al.* 1958).

Os valores de triptofano foram determinados por espectrofotometria, uma vez que a análise deste aminoácido só é possível quando a amostra é tratada em meio alcalino. Empregou-se o método descrito por SPIES (1967), usando-se hidrólise enzimática com pronase a 40°C por 24 horas. A amostra hidrolisada foi submetida à reação colorimétrica com p-dimetilamino benzaldeído (DAB) e posterior leitura em espectrofotômetro a 590nm. A concentração de triptofano foi calculada por comparação com uma curva-padrão.

Esta análise foi realizada no Centro de Química do ITAL, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, único laboratório do Brasil que prestava serviço de análise de aminoácidos dentre muitos consultados no ano de 2003. Cisteína e Metionina tiveram seus dados subestimados, uma vez que o referido centro de análise, não realiza a etapa de oxidação com ácido perfórmico a 0°C por 16 horas, necessária para que os mesmos não sejam destruídos pela etapa seguinte de hidrólise ácida.

O isolado protéico desengordurado passou por um tratamento semelhante e também foi analisado. Além disso, o mesmo foi submetido ao laboratório LABTEC (Campinas, SP) em 2004 que passou a realizar a análise completa do perfil de aminoácidos (com a etapa de oxidação).

4.4.4 Perfil de Ácidos Graxos na Farinha de Amaranto e Isolado Protéico

Os ácidos graxos foram determinados como ésteres metílicos de ácidos graxos através de cromatografia gasosa (CG). A farinha de amaranto teve seus lipídeos extraídos através de técnica de coluna seca (MARMER e MAXWELL, 1981). A formação de ésteres metílicos de ácidos graxos seguiu o método sugerido por HARTAM e LAGO (1973).

A identificação de ácidos graxos foi realizada em Cromatógrafo a Gás Chrompack CP 9002 (Middelburg, Holanda), equipado com coluna capilar CPSil88 for FAME de 50 metros, tamanho de partícula 0,2 μm. O forno foi operado com temperatura inicial de 100°C e final a 240°C, com rampa de 5°C/min. A temperatura da coluna era de 100°C, do injetor 270°C e detector 300°C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio, com fluxo de 1,5 mL/min, razão de divisão 1:70. Foi injetado um volume de 1 μL de amostra.

Os picos dos principais ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados através do tempo de retenção comparada com padrões Sigma (St Louis, USA) código 189-19 (Fatty acid methyl esters mixture), L8404 (Linoleic acid methyl ester cis/trans isomers) e L6034 (Linolenic acid methyl ester, isomer mix).

A análise foi qualitativa, sendo a proporção de cada ácido graxo calculada dividindo-se a área do seu pico pela área total da corrida. Foram seguidas as ordens de eluição dos componentes segundo a descrição da prática recomendada pala AOCS (1995), métodos Ch 2a-94 e Ce 1f-96.

4.4.5 Presença de Esqualeno no Amaranto e Isolado Protéico de Amaranto.

O esqualeno foi determinado por cromatografia gasosa na mesma corrida da determinação de ácidos graxos. A curva de calibração foi obtida através da injeção de soluções padrões de diferentes concentrações usando Esqualeno (Sigma, St Louis, USA) dissolvido em hexano grau CLAE (BERGER *et al.*, 2003; MOREDA *et al.*, 2001).

As amostras analisadas foram a farinha integral e o isolado protéico integral de amaranto. O objetivo destas análises foi de conhecer a concentração de esqualeno na farinha integral, e avaliar se as quantidades presentes no isolado poderiam interferir nos níveis plasmáticos dos animais que consumissem a dieta contendo o isolado.

4.4.6. Solubilidade de Proteínas

A determinação da solubilidade serviu ao propósito da construção de uma curva de solubilidade, podendo assim conhecer quais os melhores pH´s para extração e precipitação da proteína. A solubilidade da proteína do amaranto foi determinada preparando-se uma suspensão de água e farinha desengordurada de amaranto (10% peso/volume). A curva de diferentes pH's foi construída com

diferentes combinações de soluções tampão (DIEM & LENTNER, 1976). As soluções utilizadas foram: Ácido Cítrico 0,1M, Fosfato Dissódico 0,2M, Hidróxido de Sódio 0,1N, Ácido Clorídrico 0,1N, Glicina 0,1M em Cloreto de Sódio 0,1N (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Soluções-tampão utilizadas na construção de curva de pH para teste de solubilidade de proteína da farinha de amaranto.

pH esperado	pH determi-nado	Ácido Cítrico 0,1M (mL)	Fosfato Dissódico 0,2M (mL)	HCl 0.1N (mL)	Glicina 0,1M em NaCl 0,1N (mL)	NaOH 0,1N (mL)
0,6	0,47			18 *		
1,2	1,29			17,80	2,20	
1,6	2,12			14,70	5,30	
2,2	2,73	19,76	0,24			
3,0	3,48	16,06	3,94			
3,6	4,05	4,6	4,94	10,74	9,26	
4,0	4,38	4,8	5,09	10,24	9,76	
4,2	4,55	5,0	5,32	9,80	10,20	
4,4	4,71	5,4	5,64	8,94	11,06	
6,0	6,22	5,6	5,86	8,48	11,52	
7,0	7,09	3,80	16,20			
8,0	7,94		17,00			suficiente
9,0	8,30				17,68	2,32
9,6	9,23				14,64	5,36
10,6	9,89				16,20	3,80
11,0	10,39				10,24	9,76
11,5	11,52		1,00			17,0 **
12,0	12,00		1,00			16,0 **
12,5	12,50				1,00	15,0 **

* Ajustar com HCl 2N ** Ajustar com NaOH 2N

Este método foi escolhido, pois as soluções de diferentes pH's, preparadas a partir da adição apenas de diferentes quantidades de Hidróxido de Sódio 1N ou Ácido Clorídrico 1N, não mantinham o pH constante do início ao fim da

determinação de solubilidade das amostras, provavelmente pela presença de algum componente da matriz alimentar com características ácidas. Por isso optou-se pela construção de uma curva de solubilidade com tampões, apenas para a preparação de pH extremos, como 0,5 e 12,5, foram empregadas as soluções de NaOH 2N e HCl 2N.

Os tubos foram tampados, agitados em agitador tipo vortex e então submetidos à agitação horizontal, durante 1 hora. A seguir, centrifugou-se a 10.000 x *g* (8700 rpm) em centrífuga ALT 4239R (ALC International, Itália) durante 30 minutos. Tomaram-se alíquotas de 10 a 50µL dos tubos e completou-se o volume para 100µL com água deionizada. Procedeu-se então análise de proteína pelo método de Bradford (BRADFORD 1976), utilizando para isso 3mL de reagente de Bradford da marca Biorad, diluído 1:5. Uma curva padrão utilizando albumina bovina (Sigma A-4378) foi construída, a partir de uma solução preparada com 11mg de albumina em 10 mL (1,1 µ g/ µ L) de tampão fosfato 0,1N + NaOH 0,1N (50:37). A leitura foi realizada em espectrofotômetro Micronal B542 a 595nm.

Após retirar a alíquota de sobrenadante para a reação colorimétrica de quantificação de proteína, o restante do sobrenadante foi transferido para um recipiente com pipeta Pasteur, e o valor do pH foi aferido. Este valor de pH após a centrifugação está assinalado na segunda coluna da Tabela 4.1, e passa a ser considerado o pH da solução de extração nos gráficos apresentados no item 5.2.2.1 de resultados.

4.4.7 Eletroforese

A eletroforese SDS-PAGE foi conduzida de acordo com LAEMMLI (1970). O gel concentrador contendo 4% de acrilamida em tampão TRIS-HCl pH 6,8 foi preparado sobre o gel de análise com 10% de acrilamida em tampão TRIS-HCl pH 8,8. Os dois equipamentos utilizados para eletroforese foram do tipo vertical, da Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia) o modelo Hoefer miniVE conferiu ao gel dimensões de 8 cm x 9 cm x 1,0 mm. O equipamento Hoefer SE250 conferiu aos géis as dimensões de 8cm x 7 cm x 0,75 mm. Cinqüenta microgramas de proteína foram aplicadas em cada poço. A amperagem foi fixada em 20 mA para cada gel de 1,0 mm e 15 mA para géis de 0,75 mm; voltagem auto-ajustável, até o máximo de 300V. Após a corrida, os géis foram corados com Solução de Azul de Comassie R Brilhante 0,025% em 40% de metanol e 7% de ácido acético, e descorada no mesmo solvente sem o corante. Os padrões de peso molecular utilizados foram: β-galactosidase (175 kDa), paramiosina (83 kDa), desidrogenase glutâmica (62 kDa), aldolase (47,5 kDa), isomerase triosefosfato (32,5 kDa), β-lactoalbumina A (25 kDa), lisozima (16,5 kDa), aprotinina (6,5 kDa).

Para analisar o gel, foi utilizado um o software Gel-Pro Analyzer da MediaCybernetics (Silver Spring, USA) para determinação de peso molecular por comparação aos padrões utilizados.

4.4.8 Extração Fracionada

A extração fracionada, que serve para classificar e quantificar as proteínas presentes em albumina, globulina, prolamina e glutelina, e foi baseada nas otimizações desenvolvidas por GORINSTEIN *et al.* (1999, 2002) com os tempos de agitação e temperaturas sugeridas por BRESSANI e GARCIA-VELA (1990).

Os materiais analisados foram a farinha de amaranto integral e desengordurada e o isolado protéico de amaranto integral e desengordurado.

Para a extração fracionada a proporção amostra:solvente foi de 1:10 (massa/volume) para as duas primeiras frações e agitação em agitador horizontal tipo shaker pelo tempo indicado entre parênteses para cada tipo de fração, a seguir. Para separação das frações insolúveis as misturas foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos. Cada etapa foi repetida duas vezes, os extratos destas duas extrações foram combinados. A seqüência da extração e os solventes empregados estão detalhados a seguir:

a) Albumina-1 + Globulina: solvente empregado foi NaCl 0,5M (60min, 30min);

b) Albumina-2: solvente empregado foi água (60 min, 30 min);

c) Proteína Álcool-Solúvel (Prolamina): Isopropanol 55% contendo 4% de 2-mercaptoetanol (2-ME) na proporção 1:6 (amostra:solvente) (30 min, 30 min);

d) Glutelina: tampão borato de sódio 0,125M com adição de 3% de 2-ME e 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) na proporção 1:3 (amostra:solvente) (60min, 30 min);

e) Proteína no Resíduo: tampão hidroximetil aminometano (Tris)-glicina pH 7,5, contendo 7,5% (v/v) de 2-ME e 5% (p/v) de SDS.

As proteínas totais foram extraídas usando tampão Tris-HCl 0,125M contendo 5% de SDS e 2% 2-ME, ajustando para pH 6,8. A proporção amostra/solvente foi de 1:24 (massa/volume). A mistura foi aquecida por 5 minutos a 100°C, resfriada a temperatura ambiente e então centrifugada a 10.000 x *g* por 10 minutos.

Os extratos foram evaporados já em tubo de micro-Kjeldahl e a análise do teor de nitrogênio foi efetuada seguindo o procedimento padrão de micro-Kjeldahl.

4.5 Análises nas Rações

As rações utilizadas nos experimentos foram fabricadas sob encomenda, com ingredientes purificados, pela Rhoster Indústria e Comércio Ltda (Vargem

Grande Paulista, Brasil). As rações foram formuladas em pó, e depois passaram por processo de peletização e foram armazenados em freezer para conservação. Os detalhes sob a composição de cada dieta são dados na descrição do experimento biológico.

Todas as rações foram submetidas às análises citadas a seguir.

4.5.1. Composição Centesimal

As análises de umidade, cinzas, extrato etéreo e proteína das rações foram realizadas de acordo com metodologia da AOAC (1990). O teor de carboidratos (contendo fibras) foi calculado por diferença.

Para conversão de nitrogênio em proteína (micro-Kjeldahl) utilizou-se o fator 6,25.

A análise de extrato etéreo foi realizada em equipamento tipo Soxhlet modelo MA 486/3 Marconi (Piracicaba, Brasil), de acordo com recomendações do fabricante, utilizando como solvente o éter etílico.

4.5.2 Perfil de Aminoácidos na Farinha e Isolado Protéico de Amaranto

As rações Aminoácidos do Amaranto (AA AM) e Aminoácidos da Caseína (AA CAS), que continham uma mistura de aminoácidos livres que simulava o perfil de aminoácidos da proteína respectivamente, do isolado protéico de amaranto e da caseína, tiveram seu perfil de aminoácidos analisados, conforme metodologia descrita no item 4.4.3. Com exceção da etapa de hidrólise, já que os aminoácidos estavam na sua forma livre. Esta análise foi realizada pelo laboratório LABTEC (Campinas, Brasil).

4.5.3 Perfil de Ácidos Graxos

Procedeu-se de forma idêntica à descrita no item 4.4.4.

4.5.4 Colesterol

Os lipídeos da amostra foram extraídos em coluna de fase sólida (MARMER e MAXWELL 1981) saponificados e extraídos, conforme otimizações de BRAGAGNOLO e RODRIGUEZ-AMAYA (2001). Tomaram-se 5 mL da fração

extraída, evaporou-se com nitrogênio, e ressuspendeu-se em 800 uL de hexano grau cromatográfico. A quantificação foi realizada em equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da marca Shimadzu SCL-10A - VP, detector por arranjo de diodo e software de análise Class-VP. A coluna analítica usada foi de fase normal Hypersyl-CPS (25 cm x 4 mm e recheio de 5 μm). O volume de injeção foi de 10 μL, a fase móvel compreendia uma mistura de n-hexano/isopropanol (97:3) com fluxo isocrático de 1mL/min. O colesterol foi detectado a 206nm e os espectros de absorbância obtidos entre 190 e 300 nm. O tempo de corrida foi de 7 minutos (CSALLANY *et al.* 1989).

A curva padrão realizada com padrão 5-colestano-3-β-ol da Sigma, com os pontos 2,22; 3,17; 4,53; 6,47; 9,24 e 13,2 μg/20μL. A identificação do colesterol foi baseada no tempo de retenção e comparação com espectro de absorbância obtidos pelo detector conjunto de diodos do padrão, com isso fazendo correções necessárias para alcançar pureza mínima do pico de 97%.

4.6. Experimento Biológico

O biotério de experimentação para hamsters do Departamento de Patologia e Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da USP (LIM/50) foi utilizado para a realização dos experimentos. Os animais foram dispostos em gaiolas individuais, em local arejado e apropriado ao experimento. O ambiente tem

temperatura controlada em torno de 20 a 25°C, com janelas escurecidas para controle do ciclo de luz/escuro igualmente 12 horas/12 horas. A limpeza das gaiolas se deu uma vez por semana.

O experimento seguiu as normas do Canadian Council on Animal Care (OLFERT *et al.* 1993) e foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da USP (Anexo I).

A ração comercial utilizada durante o período de adaptação dos animais Nuvilab CR1 (Nuvital) com composição declarada pelo fabricante g/100g: 12,5 umidade máxima, 22 proteína (min), 4 extrato etéreo (min), 10 material mineral (max), 8 matéria fibrosa (max).

Os animais foram alimentados *ad libitum* e pesados semanalmente para avaliar variações de peso e crescimento, e a dieta foi pesada e trocada todos os dias para verificar a quantidade ingerida por cada animal. O coeficiente de eficácia alimentar (CEA), também denominado conversão alimentar, foi determinado através da divisão do ganho de peso total pelo consumo total de dieta durante os 28 dias de dieta experimental e 21 dias para a dieta Hiper.

A dieta foi retirada às 18 hs do dia anterior à coleta, e a coleta iniciada por volta das 9:00 horas da manhã seguinte (15 horas de jejum), por punção cardíaca com anestesia. Os anestésicos utilizados foram Ketalar® (cloridrato de cetamina: 80 mg/Kg de peso), Rompum® (xilazina: 8 mg/Kg peso). As seringas foram lavadas com heparina antes da coleta, e foram adicionados 10 μL de heparina Heptar® (5.000UI/mL) nos tubos eppendorf onde o sangue foi depositado. As amostras foram

centrifugadas a 1500 x *g* a temperatura ambiente por 15 minutos, na primeira hora da coleta, o plasma foi separado e congelado até análise.

O fígado do animal foi retirado, lavado com solução fisiológica, retirado o excesso de líquido em gaze, e pesado em balança semi-analítica.

4.6.1. Experimento Piloto

O objetivo deste experimento piloto foi estabelecer se o excesso de caseína é capaz de induzir hipercolesterolemia como ocorre com coelhos, e se ocorre com predominância de LDL-Colesterol (similarmente ao que ocorre em humanos). Além disso, era necessário estabelecer em quanto tempo isto ocorreria.

Doze hamsters (*Mesocricetus auratus*) raça *Golden Syrian* machos foram adquiridos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP, com aproximadamente 21 dias de idade (nascidos na mesma semana), recém-desmamados. Foram mantidos no biotério de experimentação para hamsters do Departamento de Patologia e Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da USP (LIM/50). Os animais foram alojados individualmente em caixas com maravalha.

Durante o período de 5 dias de aclimatação dos animais, os mesmos alimentaram-se de dieta Nuvilab CR1 (Nuvital; Colombo, Brasil). Três animais

foram sorteados, e deixados em jejum de 15 horas, sendo sacrificados após a coleta de sangue via punção cardíaca. O plasma destes animais foi utilizado para o estabelecimento dos valores basais de colesterol total e frações, bem como triglicérides.

Os nove animais restantes foram divididos em 3 grupos de 3 animais cada. Um grupo recebeu uma dieta rica em caseína (30%), o outro uma dieta padrão rica em colesterol (0,25%) e o outro uma dieta padrão rica em ácidos graxos saturados (71,1% de saturados, 19,3% de monoinsaturados e 9% de polinsaturados). Os animais foram submetidos à coleta (jejum de 15 horas) após 3 e 5 semanas após o inicio destas dietas. Foi então reintroduzida a ração comercial Nuvilab, e uma coleta foi realizada após 3 semanas, para verificação se o efeito hipercolesterolemizante não era ligado ao crescimento dos animais, e sim dependente da dieta (Figura 4.3).

A formulação da dieta foi feita baseada em outros trabalhos que desenvolveram estudos com hamsters e hipercolesterolemia (LUCAS *et al* 2001, FERNANDEZ *et al.*1999), e respeitando as recomendações nutricionais do National Research Council (NRC) (1995). Segundo DORFMAN *et al.* (2003), a adição de 0,25% de colesterol, corresponderia em humanos, ao consumo de 1.145 mg de colesterol/2000 Kcal.

A dieta foi fornecida *ad libitum*, peletizada, cuja composição está apresentada na Tabela 4.2. O teor de proteína alcançado pela adição da quantidade citada de caseína (93% de proteína) foi de 20% para as dietas Saturados e Colesterol, e de 31% para a dieta Caseína.

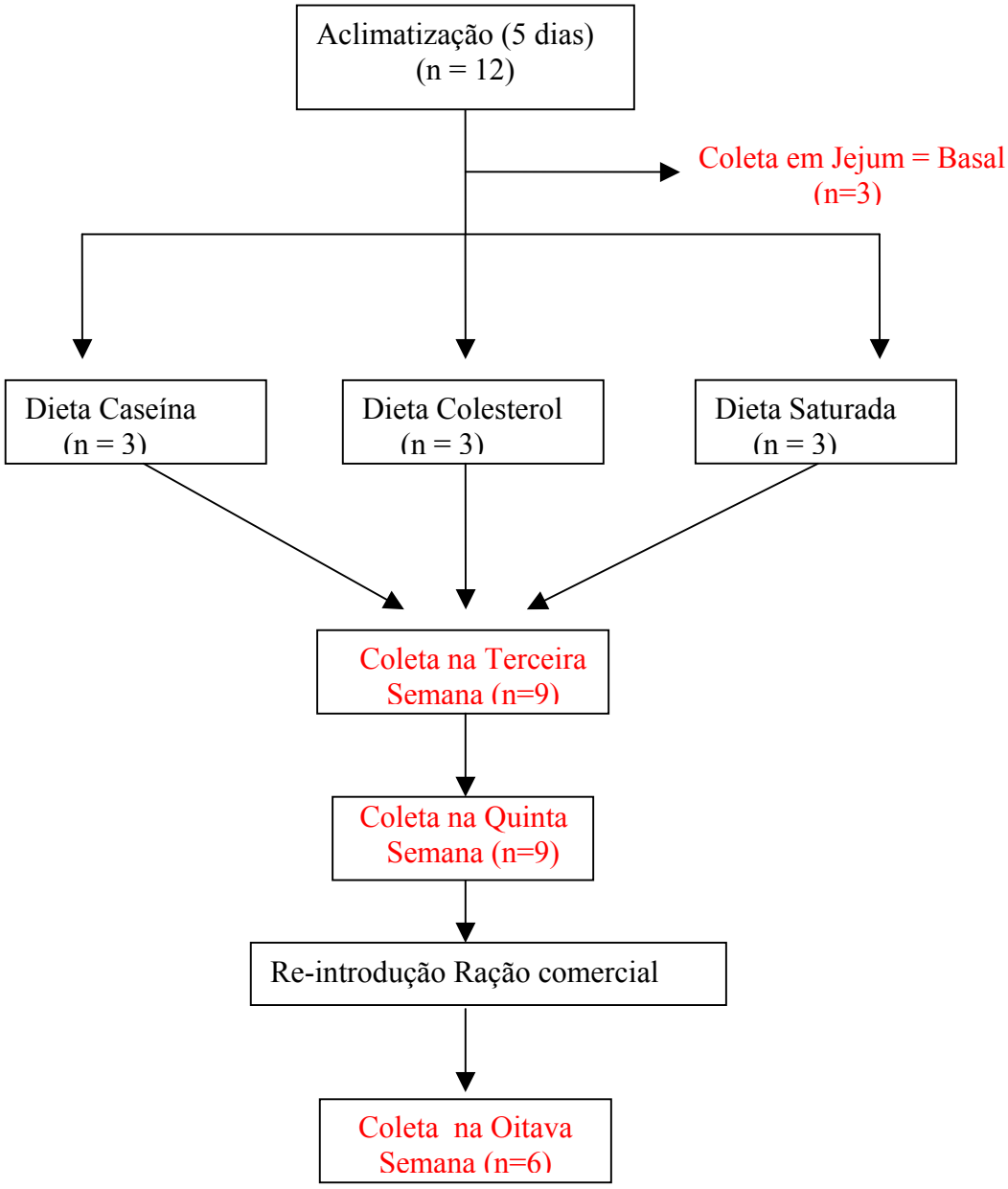


Figura 4.3. Fluxograma representando o desenho experimental do ensaio Piloto.

Tabela 4.2. Composição das rações utilizadas no experimento Piloto (dados apresentados em g do componente/100g de dieta).

	Dieta Saturados	Dieta Colesterol	Dieta Caseína
Caseína (1)	22,0	22,0	33,5
Óleo de Coco	14,0	-----	----
Óleo de Girassol	1,0	-----	----
Mistura de Óleos (2)	------	15,0	15,0
Colesterol	0,05	0,25	0,05
Bitartarato de Colina	0,2	0,2	0,2
Sacarose	15,0	15,0	15,0
Amido de Milho	38,25	38,05	26,75
Celulose	5,0	5,0	5,0
Mistura Mineral (3)	3,5	3,5	3,5
Mistura Vitamínica (3)	1,0	1,0	1,0

(1) 93% de proteína (analisado neste laboratório); (2) mistura de óleo da Tabela 4.3; (3) NRC (1995).

A seguinte mistura de óleos: 36g de óleo de girassol, 28g de óleo de canola (Bunge, Brasil) e 36g de óleo de côco foi sugerida para que a proporção de ácidos graxos saturados: monoinsaturados: polinsaturados fosse de 1:1:1.

Tabela 4.3. Composição de ácidos graxos nos óleos utilizados, e da mistura obtida pela proporção indicada de cada um dos três óleos.

	Girassol* (%)	36g de óleo de girassol	Canola Bunge** (%)	28g Óleo de Canola	Óleo de Coco*** (%)	36g de Óleo de Coco	Perfil da Mistura (%)
Saturada	10.85	**3.91**	7.1	**1.99**	75,9	**27.52**	**33.22**
Monoinsat	24.24	**8.73**	64.3	**18.0**	18,9	**6.80**	**33.53**
Poliinsat	65.33	**23.52**	28.6	**8.01**	5,2	**1.87**	**33.40**

*Girassol = Tabela Brasileira de Composição de Alimentos ** Canola= Site da Bunge Alimentos *** Óleo de Coco (analisado em nosso laboratório).

4.6.2. Experimento Hipercolesterolemizante

Com o objetivo de estudar os efeitos da contínua administração da dieta hipercolesterolemizante, rica em caseína, no perfil lipídico de hamsters ao longo do tempo semelhante ao que os animais foram submetidos, dez fêmeas foram mantidas nesta dieta, e a partir da terceira semana, foram sacrificados dois hamsters a cada duas semanas (semana 0, 3, 5, 7 e 9). O sangue foi coletado, com sacrifício, como nos experimentos anteriores.

4.6.3. Experimento Principal

Quarenta e três hamsters machos, recém-desmamados foram adquiridos Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP. Após cinco dias de adaptação ao local, recebendo ração comercial Nuvilab CR1 (Nuvital; Colombo, Brasil), 8 animais foram sorteados e sacrificados após jejum de 15 horas. O sangue foi coletado em tubos heparinizados através de punção cardíaca nos animais anestesiados. Os animais restantes foram submetidos à dieta hipercolesterolemizante escolhida no experimento piloto, que foi a rica em caseína, por 3 semanas.

Após este período, 20 animais foram sorteados e sofreram coleta por punção cardíaca sob anestesia (os mesmos procedimentos detalhados na página 51),

sem sacrificá-los ao final desta coleta. Todos os animais foram então divididos em 3 grupos procurando fazer com que houvesse um equilíbrio de distribuição de peso e igual número de animais já submetidos à coleta, entre os grupos. Cada um dos grupos recebeu uma das rações experimentais:

a) Dieta Controle: cuja única fonte de proteína é a caseína, com teor de 20% do peso da dieta.

b) Dieta Amaranto (AM): cuja única fonte de proteína é o isolado protéico de amaranto desengordurado, com teor de 20% do peso da dieta.

c) Dieta CAS+AM: proteína da dieta foi composta por 30% de proteína sendo 20% de caseína e 10% de proteína de amaranto.

Após 5 dias de introdução destas rações 5 animais de cada grupo tiveram sangue coletado; estes animais foram aqueles que não sofreram coleta ao final do período de indução de hipercolesterolemia. Decorridas 4 semanas do início da ingestão das dietas experimentais, todos os animais tiveram sangue coletado sob anestesia e foram sacrificados por hipovolemia (Figura 4.4).

Paralelamente, 10 animais obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP com aproximadamente 35 dias de vida, após cinco dias de adaptação ao local recebendo ração comercial, passaram a receber uma dieta isenta de proteína, chamada aqui de Dieta Aprotéica, *ad libitum*. Este grupo teve a função

de fornecer fezes para servir de parâmetro de excreção basal de nitrogênio para realização do teste de digestibilidade.

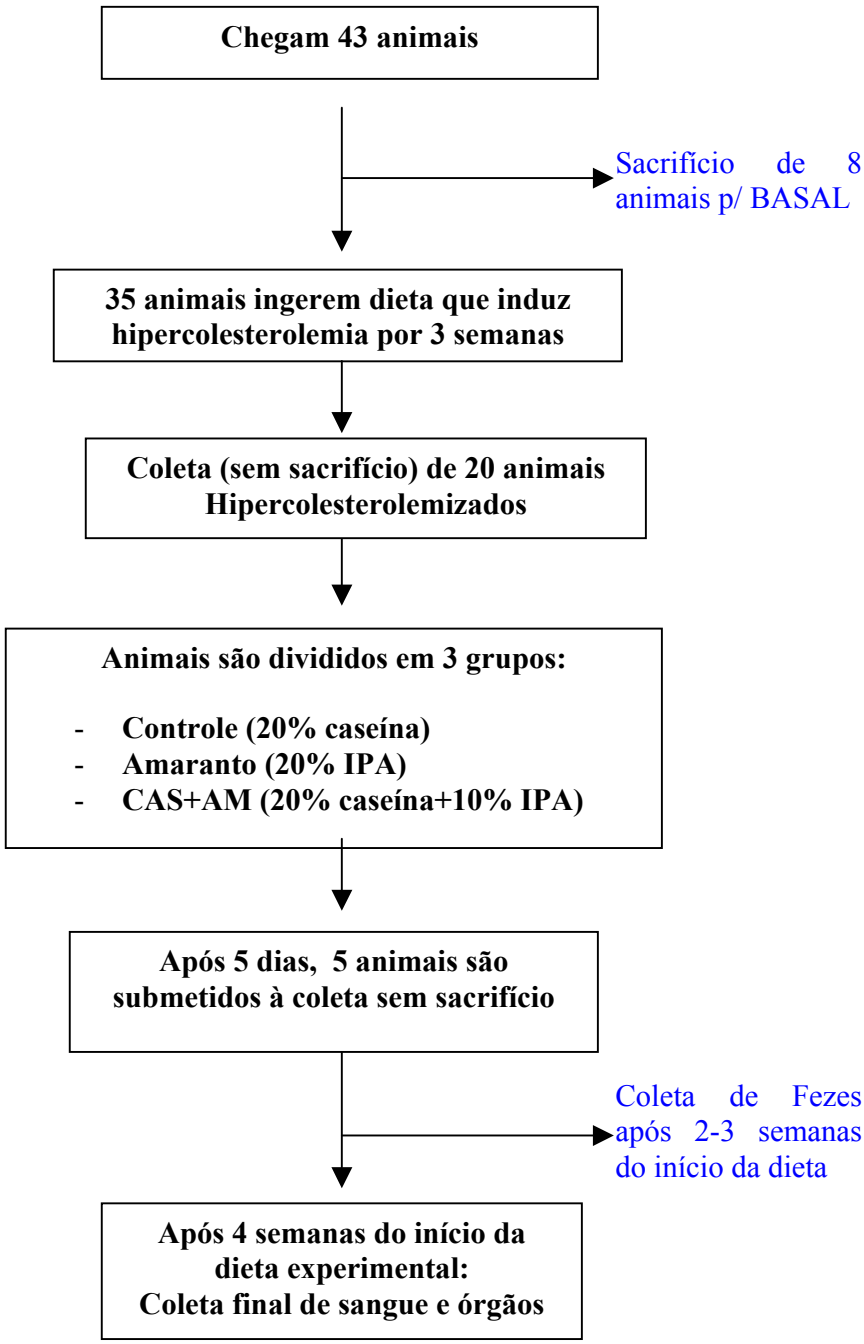


Figura 4.4. Fluxograma do experimento Principal**.**

Os animais foram alojados em gaiolas individuais, com maravalha e após 5 dias de ingestão desta dieta aprotéica, os mesmos foram transferidos para gaiolas com fundo aramado de inox, especialmente construído para coleta de fezes. A coleta de fezes foi feita durante 4 dias consecutivos. O consumo da dieta também foi aferido diariamente no mesmo período.

4.6.3.1. *Rações*

A formulação das rações foi feita baseando-se em outros estudos com hamsters e hipercolesterolemia (LUCAS *et al* 2001, FERNANDEZ *et al.*1999), respeitando as recomendações nutricionais da AIN-93 (dieta para roedores) (REEVES *et al*. 1993). A dieta foi fornecida *ad libitum*, peletizada. Sua composição é apresentada na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Ingredientes utilizados na fabricação das rações utilizadas no experimento Principal (g do ingrediente/100g de dieta).

	Dieta Hiper	**Dieta Amaranto**	**Dieta Controle**	**Dieta CAS +AM***	**Dieta Aprotéica**
IPA Des (1)	-	22,5	-	11,25	-
Caseína (2)	33,5	-	22,0	22,0	-
Mistura de Óleos (3)	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Colesterol	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Bitartarato de Colina	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Sacarose	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Amido de Milho	26,75	37,75	38,25	27,0	60,25
Celulose	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Mistura Mineral (4)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura Vitamínica (4)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

(1) Isolado protéico de amaranto desengordurado: 96% de proteína em base seca (ver Tabela 5.7); (2) 93% de proteína em base seca (analisado neste laboratório); (3) Conforme Tabela 4.3; (4) Conforme AIN-93 REEVES (1993); * Dieta Caseína + Amaranto.

4.6.4. <u>Experimento Aminoácidos</u>

Trinta hamsters fêmeas, recém-desmamadas foram adquiridas do Biotério do Instituto Adolpho Lutz. Após uma semana de adaptação ao local, recebendo ração comercial, 5 animais sorteados tiveram sangue coletado (sem sacrifício), após jejum de 16 horas, para estabelecerem-se os valores basais das lipoproteínas. O sangue foi coletado em tubos heparinizados através de punção cardíaca nos animais anestesiados. Aos animais foi administrada uma dieta hipercolesterolemizante, com 30% de caseína, igual ao do experimento principal, por 3 semanas.

Em seguida, seis animais foram sorteados e sofreram coleta por punção cardíaca sob anestesia, sem sacrificá-los ao final. Todos os animais foram então, divididos em 4 grupos (n=7 ou 8), sendo que em cada grupo foi distribuído aleatoriamente o mesmo número de animais submetidos previamente à coleta. Cada grupo recebeu uma das dietas experimentais:

a) Dieta Controle: única fonte de proteína foi a caseína, teor de 20% do peso da dieta;

b) Dieta CAS + ARG: 20% do peso em caseína, mais a adição do aminoácido arginina de modo a atingir a proporção lisina/arginina semelhante ao amaranto (0,5);

c) Dieta AA AM: mistura de aminoácidos simulando o isolado protéico de amaranto (20% do peso da dieta);

d) Dieta AA CAS: mistura de aminoácidos simulando a caseína (20% do peso da dieta).

Após uma semana de introdução destas rações (Tabela 4.5), 4 animais de cada grupo sofreram coleta de sangue. Esses animais foram aqueles que não sofreram coleta ao final do período de indução de hipercolesterolemia. Decorridas 4 semanas do início da ingestão das dietas experimentais, todos os animais tiveram sangue coletado e foram sacrificados por hipovolemia.

Tabela 4.5. Ingredientes utilizados na fabricação das rações utilizadas no experimento Aminoácidos (g do ingrediente/100g de dieta).

	Dieta Hipercoles-terolemizante	Dieta Controle	Dieta AA AM	Dieta AA CAS	Dieta CAS + ARG
Caseína (1)	33,5	22,0	-	-	22,0
Mistura de Aminoácidos (2)	-	-	20,0	20,0	-
Arginina	-				2,2
Mistura de Óleos (3)	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Colesterol	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Bitartarato de Colina	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Sacarose	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Amido de Milho	26,75	38,25	38,8	39,1	35,15
Celulose	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Mistura Mineral (4)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura Vitamínica (4)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Bicarbonato de Sódio	-	-	1,45	1,15	0,9

(1) 93% de proteína (2) Conforme Tabela 5.6 (3) Conforme Tabela 4.3 (4) Conforme AIN-93 REEVES (1993).

Os aminoácidos lisina, arginina e histidina foram adicionados nas suas formas conjugadas com HCl, e as correções de peso necessárias para alcançar os valores pretendidos são expressos na Tabela 4.6. Além disso, foi sugerida a adição de bicarbonato de sódio para neutralizar a presença destes componentes ácidos, de modo a melhorar a aceitação da dieta pelos animais (Rhoster Indústria e Comércio Ltda, comunicação pessoal).

Para alcançar a relação Lys/Arg semelhante a do isolado protéico de amaranto (que é de 0,5) a quantidade total de arginina que deveria estar presente na Dieta CAS+ARG era de 14,7 g para as 7,4 g de lisina presentes em cada 100g de caseína. Como a caseína já tinha 3,6g de arginina, bastou adicionar 11,1g de arginina para cada 100 g de caseína. Como há 20g da caseína na dieta, deve-se adicionar 2,2 g de arginina.

Tabela 4.6. Mistura de aminoácidos que visava simular o perfil de aminoácidos presentes na isolado protéico de amaranto e da caseína (g do /100g de mistura).

Aminoácido	AA da Caseína [(1)]	AA do Amaranto
Ácido Aspártico	6,5	8,2
Treonina	3,9	3,7
Serina	5,6	4,7
Ácido Glutâmico	20,8	16,6
Prolina	12,1	5,2
Glicina	1,7	6,0
Alanina	2,8	3,9
Cistina	0,4	1,8
Valina	5,6	4,6
Metionina	2,5	2,4
Isoleucina	4,8	4,2
Leucina	8,8	6,6
Tirosina	5,1	3,8
Triptofano	1,7*	1,7
Fenilalanina	4,8	4,8
Lisina**	7,4	4,9
Histidina**	2,5	2,6
Arginina**	3,6	9,8

(1) Baseado em Grundy e Adams (1983); *não referia, utilizou-se o mesmo valor do amaranto; ** estes aminoácidos foram adicionados como suas formas conjugadas com HCl.

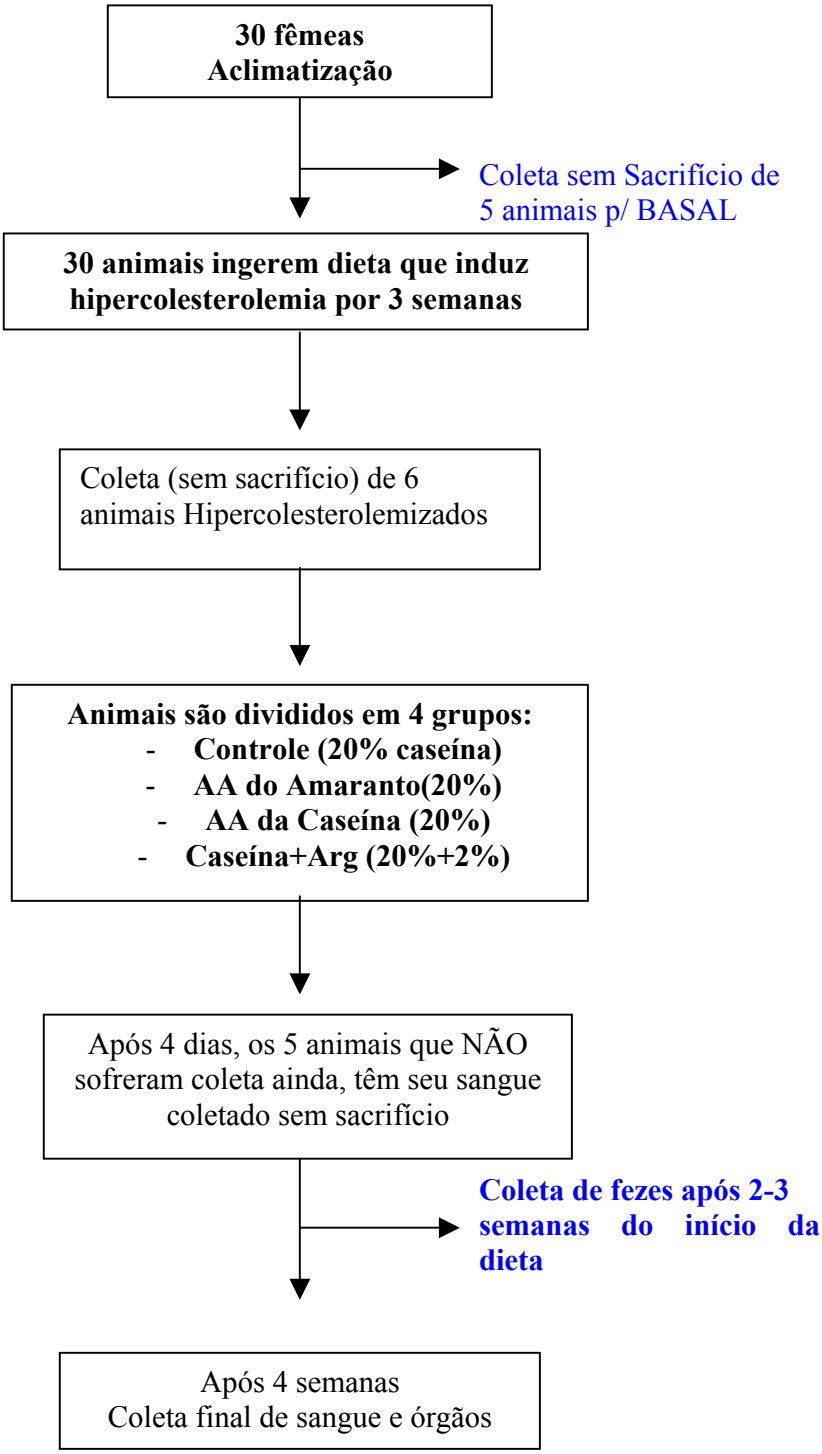


Figura 4.5. Fluxograma do experimento Aminoácidos**.**

4.6.5. Análises no Plasma

O teor de triglicérides no soro foi determinado através de kit enzimático comercial, contendo as enzimas lipase da lipoproteína, glicerolquinase, glicerol-3-fosfato oxidase e peroxidase (SOLONI *et al.*, 1971) da marca Labtest código 59 (Lagoa Santa, Brasil),

O Colesterol Total foi determinado através de kits da marca Labtest código 76 baseados no método enzimático, colorimétrico (CHOD/PAP) com colesterol esterase, colesterol oxidase e 4-aminoantipirina.

O colesterol associado à HDL (HDL-C) foi quantificado após precipitação das lipoproteínas que contêm apolipoproteína B (VLDL e LDL), seguida da quantificação do colesterol presente no sobrenadante. O agente precipitante é o ácido fosfotúngstico/cloreto de magnésio (PTA/MgCl2) (ABELL *et al.*, 1952) utilizando kit da marca Labtest código 13. Este método já foi validado para aplicação em plasma de hamsters (WEINGAND & DAGGY, 1990).

Os valores de LDL-C e VLDL-C foram calculados pela fórmula de Friedewald (FRIEDEWALD *et al.*, 1974), somados e expressos como colesterol não-HDL.

As análises do plasma dos experimentos piloto e principal foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Propriedades Funcionais de Alimentos da Faculdade de Saúde Publica (FSP) da USP. Foram utilizados kits da marca Labtest (Minas Gerais, Brasil). Estas amostras também foram analisadas no Laboratório

Central do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP), para uma validação, principalmente quanto ao teor de HDL-C, pois a análise de bancada, sem automatização, pelo alto volume utilizado, impossibilitava a repetição em triplicata das amostras. Como algumas amostras não foram analisadas no laboratório do HC, e como os valores das amostras analisadas não variaram significativamente, optou-se por adotar os valores obtidos em bancada.

As análises do plasma, dos experimentos hipercolesterolemizante e aminoácidos, foram realizadas no Laboratório Central HC-FMUSP, e desta vez, algumas amostras foram checadas em bancada na FSP, para colesterol total e triglicérides, outra vez não apresentando diferença significativa. O equipamento automatizado utilizado foi um Hitachi 911 (Roche Diagnostics, Mannheim) e kits da Roche. As amostras que apresentaram valores de LDL-C excepcionalmente baixos, tiveram as análises repetidas por método direto, utilizando-se kit LDL-C Plus (Roche), que se baseia na solubilização seletiva do colesterol LDL por um detergente não iônico e presença de magnésio.

4.6.6 Coleta e Análises das Fezes dos Hamsters

As fezes do grupo aprotéico e dos quatro grupos do experimento principal (Hiper, Controle, AM e AM+CAS) foram coletadas para análise de

digestibilidade. As fezes do experimento principal e do experimento com aminoácidos foram coletadas para avaliação de teores de colesterol e ácidos biliares.

4.6.6.1. *Coleta de Fezes:*

Cada grupo experimental teve as fezes coletadas após ingerir a dieta experimental por pelo menos 2 semanas. Os animais foram alojados em gaiolas especialmente construídas para esta finalidade (ver Figura 4.6). Uma caixa com maravalha ao fundo, era coberta por uma tela de aço inox que permitia que a urina passasse enquanto as fezes ficassem retidas. Uma outra caixa de polietileno (com fundo cortado) foi encaixada na primeira de modo que a altura da grade superior fosse suficientemente confortável para os animais. Após dois dias de adaptação às gaiolas, as mesmas foram limpas e as fezes começaram a ser coletadas após 24 horas. As fezes foram acondicionadas em frascos de polietileno, e submetidas à secagem durante 48-72 horas em estufa com circulação de ar, com temperatura de 45-50°C. Após este período, as fezes foram pesadas, trituradas, e armazenadas a –20°C até análise.

4.6.6.2. *Digestibilidade da Proteína*

A digestibilidade verdadeira é calculada medindo-se a quantidade de nitrogênio ingerido na dieta, a quantidade excretada nas fezes durante o experimento e a perda metabólica no material fecal determinada no grupo aprotéico (FAO/WHO, 1991).

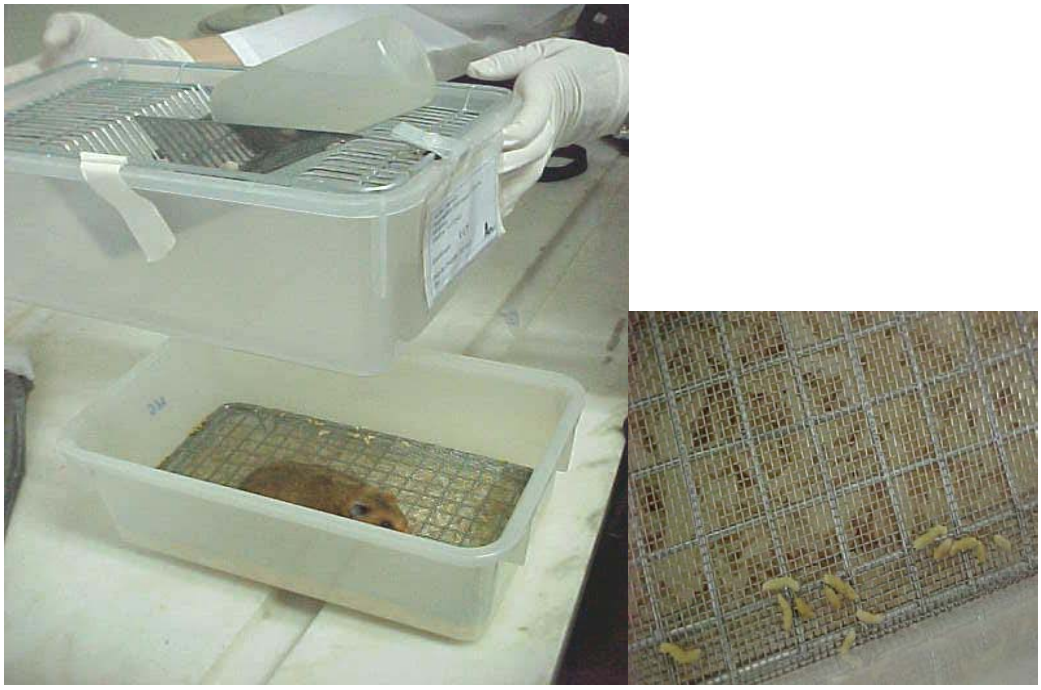


Figura 4.6 Gaiolas especiais para coleta de fezes, no detalhe, a tela de aço inox com fezes retidas.

Um grupo de dez hamsters foi alimentado com uma dieta isenta de proteínas (aproteíca), para avaliação do teor de nitrogênio nas fezes, que será considerada a perda metabólica de nitrogênio, que deve ser descontado dos resultados obtidos nas fezes dos grupos experimentais para cálculo de digestibilidade verdadeira.

As fezes secas foram analisadas para determinação do teor de nitrogênio pelo método de micro-Kjedhal.

$$\text{Digestibilidade Verdadeira (\%)} = \frac{I - (F - F_k)}{I} \times 100$$

Onde:

I= g de nitrogênio ingerido

F= g de nitrogênio excretado nas fezes pelo animal que se alimenta da dieta em teste

F_k=g de nitrogênio excretado nas fezes do animal que se alimenta com dieta aproteíca

4.6.6.3. Colesterol

Cinqüenta miligramas das fezes foram submetidos à saponificação com 700 uL de metanol e 220 uL da solução de NaOH 5M, por duas horas em banho-maria com agitação horizontal, a 80°C. Após a adição de solução saturada de NaCl, o colesterol foi extraído três vezes com 3 mL de éter de petróleo (TERPSTRA *et al.* 1998). A amostra foi então seca em estufa a 40-45°C com circulação de ar e ressuspendida em 800 uL de hexano grau cromatográfico. A quantificação foi realizada nas mesmas condições descritas no item 4.5.4, com exceção da coluna, que foi substituída por outra coluna de fase normal com ciano, coluna Luna CN da Phenomenex (25 mm x 4,5 mm diâmetro).

4.6.6.4. Ácidos Biliares

Os ácidos biliares totais foram quantificados utilizando um kit comercial para determinação de ácidos biliares totais, da marca Diazyme (San Diego, EUA) kit DZ042A. Previamente, as fezes foram submetidas à extração com *tert*-butanol a 50% por 15 minutos a 37°C e centrifugação a 10.000 x *g* por 2 minutos (VAN DER MEER *et al.* 1985).

4.7 Análises Estatísticas

Os resultados de composição da matéria-prima e rações tiveram seus valores de média e desvio padrão (DP) calculados pelo programa Excel (Microsoft).

Para comparação de médias de peso do animal, peso do fígado, consumo total, coeficiente de eficácia alimentar, peso do fígado, peso das fezes, teor de ácidos biliares e colesterol nas fezes, foi empregado teste de Tukey, para amostras independentes, experimento inteiramente casualizado, com α de 5%, utilizando o programa Assistat 7.3 Beta (SILVA e AZEVEDO, 2002).

A análise dos resultados do experimento biológico (consumo e perfil lipídico) foram realizadas em parceria com o Instituto de Matemática e Estatística (IME) da USP. Os dados foram processados através dos softwares Minitab Release 14 for Windows e SPSS 12.0 (SPSS Inc, USA), e foram realizadas Análise Descritiva Unidimesional, Análise de Variância com Efeitos Fixos e Comparações Múltiplas de Bonferroni (BUSSAB e MORETTIN, 2004), ao nível de 10% de probabilidade, e Coeficiente de Correlação de Pearson.

Os programas utilizados para a construção dos gráficos foram Excel (Microsoft) e o Origin 6.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da Matéria-Prima

5.1.1 Granulometria

A granulometria da farinha desengordurada, utilizada na produção de isolado protéico de amaranto, está distribuída da seguinte forma:

Tabela 5.1 Granulometria da farinha desengordurada de amaranto.

Tyler	Abertura (mm)	%
20	0,850	0,1
35	0,420	8,0
60	0,250	26,0
80	0,177	29,0
100	0,150	12,0
Fundo	-	23,0

5.1.2 Composição Centesimal da Matéria-Prima

Na Tabela 5.2 estão apresentados dados de composição do amaranto e da farinha desengordurada de amaranto, as análises foram realizadas em triplicata e os valores de carboidratos foram calculados por diferença.

Tabela 5.2 Composição centesimal (base seca) do amaranto (*Amaranthus cruentus* BRS-Alegria) e farinha desengordurada de amaranto.

	Amaranto cruentus	Farinha desengordurada
Umidade	10,9 (±0,03)	9,43 (± 0,82)
Cinzas	2,1 (±0,05)	2,2 (±0,06)
Proteína*	13,9 (±0,95)	15,7 (±0,91)
Lipídeos	7,3 (±0,16)	2,0 (±0,03)
Fibra Alimentar Total	7,7 (±0,98)	8,1(±0,98)
- Insolúvel	6,8 (±0,72)	7,2 (±0,76)
- Solúvel	0,89 (±0,29)	0,9 (±0,31)
Carboidratos **	69	72

*Nx 5,30; **calculado pela diferença (base seca); valores entre parênteses: desvio padrão

Para efeito de comparação do teor de proteína com outros trabalhos é importante lembrar que o fator de conversão de nitrogênio para proteína utilizado por vários autores (6,25) era diferente do empregado neste trabalho (BRESSANI e GARCIA-VELA 1990; IMERI *et al*. 1987; LUQUEZ *et al*. 1996). Portanto, a comparação baseada no teor de nitrogênio é mais adequada. BETSCHART *et al.* (1981) encontraram 2,96% de nitrogênio, BRESSANI e GARCIA-VELA (1990)

2,51%, ambos no *A. cruentus* proveniente da Guatemala. YANEZ *et al.* (1994), caracterizando amaranto de duas safras no Chile, encontraram valores de 2,15% e 2,50% de nitrogênio. MARCÍLIO (2003) determinou o teor de nitrogênio no *A. cruentus* Var. japônica cultivado no Brasil, e encontrou 2,59%. No presente trabalho, o valor de nitrogênio determinado foi de 2,62%.

O teor de lipídeos para o *A. cruentus*, 7,3%, foi semelhante ao encontrado por outros autores: 7,4% por BETSCHART *et al*. (1981), 6,6 e 7,3% por YANEZ *et al*. (1994) e 6,3 a 8,1% por BECKER *et al*. (1981).

5.2 Produção do Isolado Protéico de Amaranto

5.2.1. Tentativas de Produção em Escala Piloto

Embora em escala laboratorial a obtenção de isolado protéico de amaranto tenha se mostrado eficiente, a preparação dos aproximadamente 900 gramas de isolado protéico para o ensaio biológico pretendido seria bastante trabalhosa, uma vez que o limite de volume para cada centrifugação no equipamento disponível em nosso laboratório é de, no máximo, 400mL, e a extração envolveria aproximadamente 13 quilogramas de amaranto acrescidos de 130 litros de solução alcalina.

Por isso foram feitas algumas tentativas para a produção deste isolado em escala piloto, que não foram bem sucedidas. A primeira tentativa foi a de utilização de uma centrífuga de fluxo contínuo Alfa-Laval (Suécia) que se encontra na Unidade Semi-Industrial do Departamento de Engenharia Química, da Universidade de São Paulo, e de construção semelhante a da Figura 5.1.

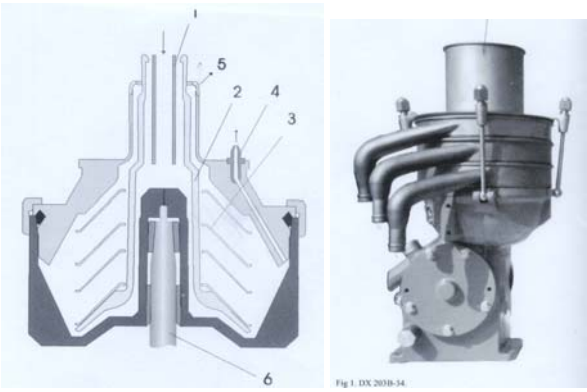


Figura 5.1 Ilustração de centrífuga de fluxo contínuo similar à utilizada.

Uma mistura de farinha e água, na proporção 1:10, com pH 11 obtido através da adição de NaOH 1N, foi agitada e introduzida através do alimentador da centrífuga. O sobrenadante, onde estava presente a proteína, foi recuperado e o precipitado depositado nos discos da centrífuga, ao invés de sair pelo orifício onde substâncias sólidas devem ser expelidas. O equipamento foi desmontado para efetuar-se a limpeza do mesmo.

O sobrenadante teve seu pH ajustado para 4,9 e deixado em repouso por 1 hora para ocorrer a floculação das proteínas, que se tornam insolúveis. Prosseguiu-

se então com a segunda centrifugação, sendo que nesta etapa o interesse era recuperar o precipitado (isolado protéico). Novamente, o precipitado acumulou-se nos discos que compõem o aparato interno da centrífuga, o que dificultou a recuperação do mesmo. Além disso, o sobrenadante ainda continha considerável quantidade de proteína, pois ao ser aquecido, floculava e podia-se separar esta proteína através de centrífuga de laboratório.

Houve recuperação de apenas 23,7% da proteína inicialmente presente na farinha e com teor de proteína de 48,3% (determinada através de teste de micro-Kjeldahl), o que mostra que o amido e outros componentes não foram eficientemente separados. Devido à baixa pureza, este produto não poderia ser chamado de isolado protéico (para tal deve ter no mínimo 90% de proteína) (SOY PROTEIN COUNCIL 1987).

Como segunda tentativa de executar o processo de isolamento em escala piloto, utilizou-se uma centrífuga de cesto da empresa Nutribrás Ltda (Guarulhos, Brasil) revestida com meio filtrante de 120 mesh e sobreposta com papel de filtro Whatmann número 4, utilizando-se das mesmas condições descritas anteriormente de pH e proporção de farinha-solvente. Já na primeira etapa, não houve separação da parte sólida e líquida com eficiência, sendo grande quantidade de amido presente no sobrenadante, que precipitaria na etapa seguinte, produzindo um isolado com inadequado grau de pureza. O grânulo de amido do amaranto, possui tamanho bastante inferior aos grânulos de outros grãos de cereais e leguminosas, tendo tamanho médio de 1 micra (WILHELM *et al.* 2002), o que torna difícil sua eliminação.

Novos testes foram feitos em laboratório com meios filtrantes de malha mais fechada, expressa em capacidade filtrante do meio (Cfm): NY1231 (1-3cfm), NY1241 (5-8 cfm), PP3271 (25-30 cfm), PP 3881 (80 cfm), onde Cfm representa pés cúbicos/pés quadrados/ min / 1/2”coluna d’água. Após a mistura da farinha em meio alcalino, e homogeneização por 10 minutos em homogeneizador de laboratório Ultra-Turrax e 1 hora em agitador horizontal, foi realizada uma filtração em funil de buchner revestido com o meio-filtrante em kitassato, com auxílio de bomba de vácuo para a obtenção do 1º sobrenadante. Após o ajustar o pH para 4,9 e repouso de uma hora, o sobrenadante foi filtrado no mesmo meio-filtrante com vácuo, e nada foi retido. A amostra foi aquecida, e nova filtração realizada, e então se pode constatar a formação de pequena quantidade de isolado protéico.

Foi coletado o sobrenadante da primeira filtração para determinação do teor de sólidos e proteína nestes sólidos, e o “isolado protéico” para análise de proteína, através do método de micro-Kjeldahl. Os testes foram realizados duas vezes com resultados semelhantes. Os resultados apontaram que a extração da proteína (presente no sobrenadante) foi de 55 a 63%, no entanto não foi obtida uma pureza adequada no final do processo, apresentando teores de proteína de 15 a 39%.

Concluiu-se que, independentemente do meio filtrante utilizado, esta não é uma forma eficiente de obtenção de isolado protéico de amaranto por proporcionar baixa recuperação da proteína e baixa pureza do isolado protéico.

A terceira opção para processamento foi o uso de um equipamento de Ultrafiltração QuixStand da Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia) (Figura 5.2). O experimento tinha como estratégia eliminar o amido e fibras numa primeira

filtração em coluna de valor nominal de peso molecular de corte (NMWC) de 500 KDa, com lúmen de 1mm e área de 0,011m^2, onde a proteína sairia no permeado enquanto o amido ficaria retido na coluna e voltaria para o alimentador. Na segunda etapa o permeado passaria por uma outra coluna, de NMWC 5 KDa, com lúmen de 0,5mm e área de 0,014m^2, o que reteria a proteína na coluna voltando para o recipiente de alimentação, enquanto outros componentes de menor peso molecular passariam pela coluna e sairiam no permeado, concentrando a proteína. As colunas utilizadas foram da marca Amersham (Uppsala, Suécia).

Figura 5.2 Equipamento de ultracentrifugação QuixStand da Amersham Biosciences.

A amostra foi preparada como anteriormente. Na primeira tentativa de passar esta amostra sem filtração, houve entupimento da coluna. Então, optou-se por

previamente filtrar a amostra utilizando para isso o meio filtrante Tegape PP3271 por sua boa recuperação de proteínas na primeira fase de extração, conforme testado anteriormente. Esta filtração resultou em perda de 42,6% da proteína.

A primeira ultrafiltração levou 3 horas e 8 minutos, e conseguiu extrair ao final, apenas 21% da proteína presente na mistura filtrada. Dos sólidos presentes neste permeado, 37,3% eram proteínas. No resíduo presente no reservatório do ultrafiltrador ao final do experimento, havia ainda em torno de 75% da proteína inicialmente presente na mistura, que não foi extraída.

Na segunda ultrafiltração, quando o reservatório apresentava 500 dos 1000mL originais, coletou-se uma amostra do reservatório, e verificou-se que os sólidos presentes continham 45% de proteína, ou seja, houve uma concentração da proteína que originalmente era de 37,3% dos sólidos. Ao continuar o processo por mais 4 horas, obteve-se uma concentração do volume do reservatório para 125 mL. O teor de proteínas dos sólidos obtidos deste concentrado foi de 71% e a massa total de proteínas presentes nesta etapa foi de 1,1 g (havia 1,72g no início desta segunda etapa). Estas etapas estão esquematizadas na Figura 5.3.

Concluiu-se, com isso, que a primeira etapa foi crítica, fazendo com que mesmo após 3 horas de processo 75% da proteína ainda não havia sido extraída. Na segunda etapa, após 7 horas de extração, obteve-se uma pureza de 71% da proteína presente, o que foi um bom resultado. No entanto, esta etapa também proporcionou perda de 36% da proteína que havia no permeado da primeira etapa.

A ultrafiltração mostrou-se útil no isolamento de proteína, mas alguns fatores inviabilizam a utilização desta forma de processo neste projeto:

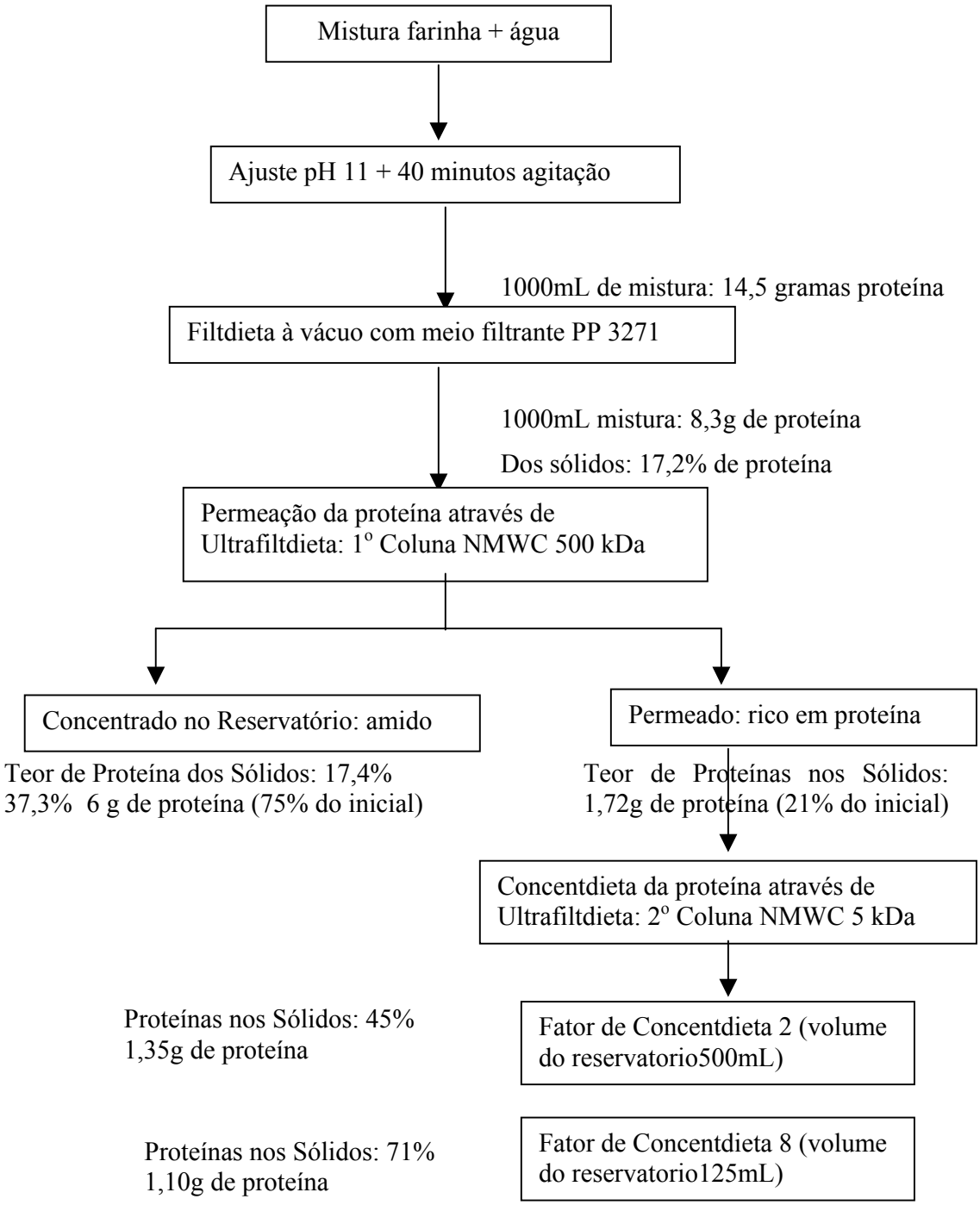


Figura 5.3 Fluxograma do processo de ultrafiltração acompanhado das principais determinações de teor de proteína.

a) o tempo para promover uma melhor extração da proteína na primeira etapa da ultracentrifugação foi grande demais, e provavelmente não poderá ir muito além do ponto testado, pois a continuação do processo leva a concentração do amido no tanque de alimentação o que levaria ao entupimento dos microcapilares da coluna.

b) a segunda etapa também necessita de tempo superior a 7 horas, pois se deseja um isolado com no mínimo 90% de proteína e com este tempo obtiveram-se apenas 71% de pureza, além da perda de 36% da proteína existente no início.

5.2.2 Produção do Isolado Protéico em Escala Laboratorial

Uma vez que não foi possível a produção do isolado protéico em escala piloto, com rendimento e pureza recomendados, o isolamento foi realizado repetidamente durante 2 meses, em laboratório, até ser obtida a quantidade necessária de isolado protéico para o ensaio biológico planejado.

5.2.2.1 Solubilidade em vários pHs

Através da curva de solubilidade em vários pHs pode-se determinar tanto o ponto isoelétrico médio das proteínas do amaranto como verificar quais as regiões de pH de maior solubilidade das mesmas. O ponto isoelétrico é o pH no qual a proteína apresenta o número de cargas positivas e negativas equivalentes permitindo maior ocorrência das interações proteína-proteína, menor interação com a água e, conseqüentemente, menor solubilidade da mesma (VOJDANI 1992). Após extrair a proteína da matriz original geralmente em um meio bastante alcalino, onde se observa máxima solubilidade, o sobrenadante deve ser acidificado até chegar ao pH correspondente ao ponto isoelétrico médio das proteínas em questão, pois estas irão precipitar promovendo, a sua fácil separação dos outros componentes.

Os resultados do teste de solubilidade (Figura 5.4) mostram que a solubilidade da proteína está bastante aumentada em pH superior a 10, sendo esta faixa que deve ser utilizada para extrair a proteína. O pH de menor solubilidade foi de 3,48.

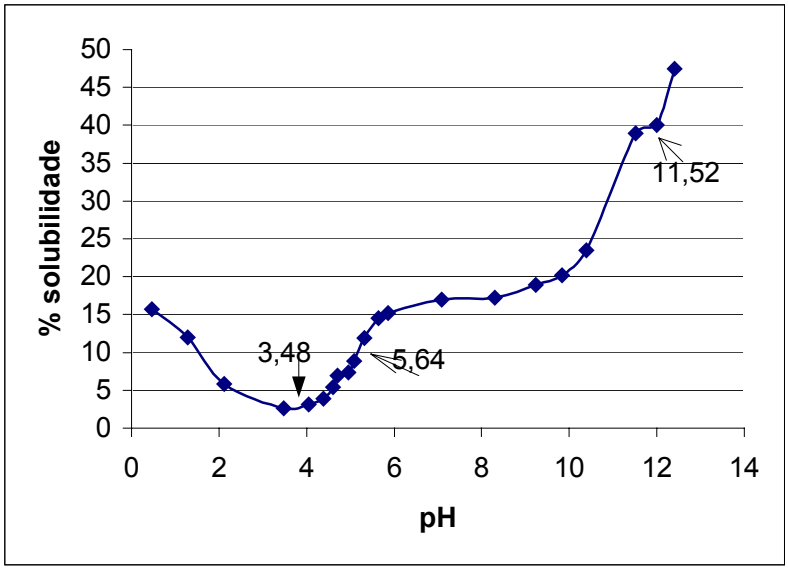


Figura 5.4. Curva de solubilidade de proteína (% de nitrogênio) de amaranto desengordurado em diferentes valores de pH, determinado pelo método de Bradford.

5.2.2.2 Seleção das condições do processamento

SALCEDO-CHÁVEZ *et al.* (2002) recomendam a precipitação da proteína de *Amaranthus cruentus* em pH 5,7, embora o ponto isoelétrico observado para a mesma tenha sido 4,0, e relatam que pHs extremamente baixos são difíceis de serem mantidos e podem alterar a estabilidade térmica das proteínas do isolado do amaranto.

Como a literatura difere ligeiramente quanto às condições ótimas de processamento, decidiu-se testar as condições ótimas sugeridas por SALCEDO-

CHÁVEZ *et al.* (2002) e PAREDES-LOPEZ *et al*. (1988), para escolher qual melhor se adaptaria ao amaranto desengordurado em questão. Os primeiros autores sugeriram que o isolado fosse feito em pH 9,2 para extração e 5,7 para isolamento da proteína, ao passo que os outros sugeriram extração em pH 11 e isolamento em pH entre 4,5 e 5,5.

O seguinte teste foi realizado: a uma mistura de farinha e água (1:10) foi adicionada solução de NaOH 1N até que fosse atingido o pH 9,0 ou 11,0. A suspensão foi então submetida a 2 horas sob agitação após o que se deixou em repouso neste pH por uma noite em geladeira. A amostra foi centrifugada a 10.000 x *g* por 30 minutos e foram determinados o pH pós-centrifugação e o teor de proteínas no sobrenadante, para verificar qual pH estava extraindo maior quantidade de proteína. A seguir, a proteína foi precipitada alterando o pH do sobrenadante para 4.7 ou 5,7 pela adição de solução de HCl 1N, uma hora de repouso e nova centrifugação a 10.000 x *g* por 30 minutos. Os testes foram realizados em duplicata. Um resumo das condições testadas e os resultados obtidos são representados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Eficiência da extração e teor de proteína no isolado protéico nos diferentes pH´s testados para a obtenção de isolado protéico de amaranto

pH de extração	*pH de isolamento*	*% Proteína-Sólidos Do Sobrenadante*	*% Proteína Extraída*	*% Proteína no Isolado*
11,0	4,7	49,8	14,6	74,3
11,0	5,7	49,8	14,6	78,5
9,0	4,7	36,7	14,2	61,3
9,0	5,7	36,7	14,2	68,3

Após a primeira etapa de centrifugação verificou-se que o sobrenadante das amostras extraídas com pH 11 era mais límpido, além disso, o teor de proteína do isolado obtido na seqüência foi maior com este pH, com isso conclui-se que o pH 11 é mais eficiente para extração e pureza do isolado protéico de amaranto (Tabela 5.3).

Embora a diferença entre o pH de precipitação 4,7 e 5,7 não seja marcante quanto ao teor de proteína alcançado, optou-se pelo pH 5,7, pois o seu perfil eletroforético apresentou maior riqueza de frações, e mostrou uma subunidade de maior peso molecular (191 KDa) que não aparecia quando a proteína foi isolada em pH 4,7 (Figura 5.5 e Tabela 5.4).

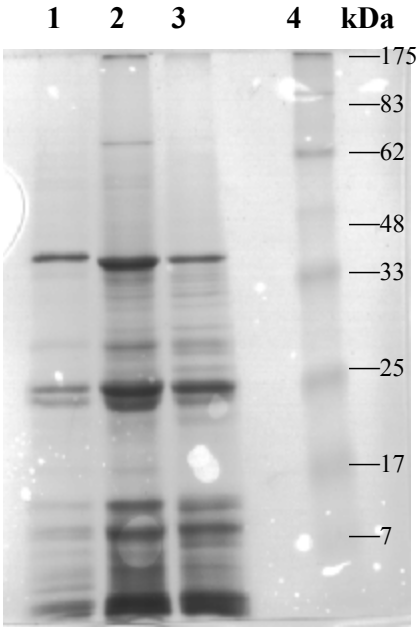


Figura 5.5 Gel de Eletroforese 10% SDS-PAGE de Amaranto. 1º perfil : farinha de amaranto integral; 2º perfil: isolado protéico de amaranto isolado a pH 5,7; 3º perfil: isolado protéico de amaranto isolado a pH 4,7; 4º perfil: mistura de padrões de peso molecular.

Tabela 5.4 – Perfil de pesos moleculares obtidos pela eletroforese do amaranto e dos seus isolados protéicos produzidos nos pH 4,7 e 5,7.

Amaranto Integral	pH 5,7	pH 4,7	Padrão PM
	191		175
85			83
67	65	67	
62	62	62	62
	60	60	
		59	
		56	
54	54	54	
		53	
		51	
49	49	49	
48	47	48	48
	42	42	
	32		33
28	28	28	
25	24	25	25
		23	
	20	20	
17	18		17
12		11	
6	8	8	6,5

Como teste confirmatório realizou-se o isolamento da proteína com maiores quantidades de amostra (300g + 3000mL de água) diferindo apenas no pH de precipitação. Para isolados obtidos através da precipitação em pH 4,7 obteve-se em média 75,9% de proteína (desvio padrão=1,73) e para precipitação em pH 5,7 obteve-se em média 86,7% de proteína (desvio padrão=0,70), em base seca.

Embora o ponto isoelétrico esteja em torno do pH 3,5 e 4,0 (Figura 5.4 e 5.5), a maior pureza do isolado protéico foi obtida quando a precipitação da proteína foi realizada em pH 5,7, conforme sugerido por SALCEDO-CHAVEZ *et al*. (2002).

5.2.2.3 Desengorduramento do Isolado Protéico de Amaranto

Como o teor de lipídeos no isolado protéico era grande, pois houve concentração daqueles 2% de lipídeos presentes na farinha desengordurada de amaranto durante o processo de isolamento da proteína, foi necessária uma nova extração da fração lipídica.

O solvente que melhor extraiu a fração lipídica do isolado protéico de amaranto liofilizado foi o álcool etílico (Tabela 5.5). A extração de componentes lipossolúveis (dentre eles o esqualeno) é de extrema relevância para que outros componentes com potencial efeito hipocolesterelomizante sejam eliminados.

Tabela 5.5 – Porcentagem de lipídeos extraídos por diferentes métodos/solventes empregados no desengorduramento do isolado protéico de amaranto.

Método de Desengorduramento	Constante Dielétrica do Solvente (ε)	Lipídeos Extraídos (% amostra úmida)
Coluna Seca com Diclorometano/Metanol (9:1)	11,53*	15,47 (±0,09)
Soxhlet com Hexano	1,89	1,50 (±0,12)
Soxhlet com Éter Etílico	4,33	7,72 (±0,11)
Soxhlet com Álcool Etílico	24,55	16,0 (±0,49)

* calculado; Valores entre parênteses= desvio padrão (n=triplicata)

Embora fosse provável que uma pequena parte de proteína com características hidrofóbicas ou álcool solúvel, como é o caso de prolaminas, possa ter se perdido durante este processamento, isto não ocorreu (ver item 5.3).

5.2.2.4 Rendimento do Processo

Considerando os teores de proteína em base úmida, os 13,4 quilos de farinha desengordurada de amaranto (14,2% proteína) renderam 930 gramas de isolado protéico liofilizado (80% proteína) e após desengordurar, 774 gramas de isolado protéico desengordurado (88,8% de proteína). Isto significou uma recuperação (porcentagem da proteína total da farinha que foi recuperada no isolado protéico) de 36,1% ao final de todo processo.

SALCEDO-CHAVEZ *et al.* (2002) realizando a extração da proteína em pH 9,2 e a precipitação em pH 5,7, obteve um produto com 89,2% de proteína, com uma recuperação em torno de 60%.

Conforme apresentado na Tabela 5.6 o teor de proteína alcançado no IPA (isolado protéico de amaranto) desengordurado está acima dos 90% recomendados pelo SOY PROTEIN COUNCIL (1987). Os lipídeos que haviam se concentrado durante o isolamento da proteína foram eliminados eficientemente pelo desengorduramento do isolado com álcool etílico.

Tabela 5.6. Alteração da composição centesimal (base seca) do amaranto durante a produção do isolado protéico de amaranto desengordurado.

	Amaranto Integral	Farinha Desengordurada	Isolado Protéico	Isolado Protéico Desengordurado
Umidade	10,9 (±0,03)	9,43 (± 0,82)	6,3 (± 0,7)	5,1(±1,0)
Cinzas	2,1 (±0,05)	2,2 (±0,06)	1,6 (± 0,0)	1,2 (±0,0)
Proteína*	13,9 (±0,95)	15,7 (±0,91)	85,4 (± 5,7)	96 (± 1,8)
Lipídeos	7,3 (±0,16)	2,0 (±0,03)	7,7 (± 0,1)	0,7 (± 0,2)
Fibra Alimentar Total	7,7 (±0,98)	8,1 (±0,98)	Nd	Nd
- Insolúvel	6,8 (±0,72)	7,2 (±0,76)		
- Solúvel	0,89 (±0,29)	0,9 (±0,31)		
Carboidratos **	69,0	72,0	5,3	2,1

*Nx 5,30 para amaranto e 6,17 para isolado protéico de amaranto; **calculado pela diferença (base seca);Nd= não determinado
Valores entre parênteses = desvio padrão

5.3 Extração Fracionada

A soma de albuminas, globulinas e nitrogênio não protéico neste trabalho gerou um valor de 52%, semelhante ao encontrado para o *A. cruentus* (53,1%) por BRESSANI e GARCIA-VELA (1990). No entanto, os valores de prolamina do presente trabalho são bastante inferiores aos relatados por estes autores (prolamina 10,4% e glutelina 30%). GORINSTEIN *et al*. (1991) contudo, enconcontraram no *A. cruentus* 58,8% de albumina+globumina+nitrogênio não protéico, 1% de prolamina, 23,2%de glutelina e 13,1% de proteína no resíduo.

GORINSTEIN *et al.* (2002) relatam que a glutelina corresponde a 27% das proteínas do *A. caudatus,* enquanto KONISHI *et al*. (1985) obtiveram 21% na

mesma espécie. BRESSANI e GARCIA-VELA (1990) encontraram 30% de glutelina no *A. cruentus*. No entanto, na farinha de amaranto integral do presente trabalho (*A. cruentus*) apenas 11% foi detectado. Considera-se que o método de fracionamento não foi totalmente eficiente na quantificação das frações, principalmente no que se refere à extração da glutelina, o que é confirmado pela quantidade de proteína ainda presente no resíduo.

SEGURA-NIETO *et al*. (1992) relatam que a globulina deveria ser extraída com alta força iônica (NaCl 1M) após a extração da albumina (NaCl 0,1M). No presente trabalho, a extração foi feita com NaCl 0,5M e no primeiro passo, o que poderia explicar o alto teor de proteína no resíduo.

A glutelina teve sua proporção diminuída em 40% no amaranto desengordurado, ao passo que a prolamina aumentou em 30%, conforme indicado na Tabela 5.7. Além disso, pode-se observar que a porcentagem de nitrogênio recuperado na farinha desengordurada foi menor do que na integral, o que indica tanto diminuição da solubilidade das proteínas por alterações estruturais, quanto perda de nitrogênio não-protéico durante o processamento.

PAREDES-LOPEZ *et al.* (1993) estudaram, através de diversas técnicas de extração fracionada, o efeito do solvente na solubilidade protéica, e encontraram resultados semelhantes. A glutelina se apresentou 22% menor e a prolamina 30% maior na farinha desengordurada. A taxa de nitrogênio extraído foi de 88% (integral) para 82% (desengordurada).

Tabela 5.7 - Extração fracionada da farinha de amaranto integral e desengordurada (g proteína/100g de amostra).

Fração Protéica	Farinha Integral	Farinha Desengordurada
Albuminas + globulinas + NNP*	41,8 (±2,8)	40,7 (±1,1)
Albumina-2	10,3 (±2,4)	9,6 (±0,4)
Prolaminas	0,7 (±0,1)	1,0 (±0,0)
Glutelinas	10,8 (±0,4)	6,5 (±3,0)
Resíduo	32,0 (±1,5)	29,1 (±1,8)
% recuperação de Nitrogênio	95,5 (±3,3)	84,8 (±5,6)

*NNP: nitrogênio não protéico

5.4 Eletroforese da Farinha e do Isolado Integral e Desengordurado

Para avaliar a perda de frações protéicas durante o isolamento ou desengorduramento, foi realizada eletroforese e o resultado apresentado abaixo na Figura 5.6 e na Tabela 5.8. Apenas algumas frações de baixo de peso molecular e uma fração de peso molecular em torno de 68 kDa foram perdidas durante o processo de isolamento, pois estão presentes no amaranto integral e desengordurado mas não no isolado protéico de amaranto.

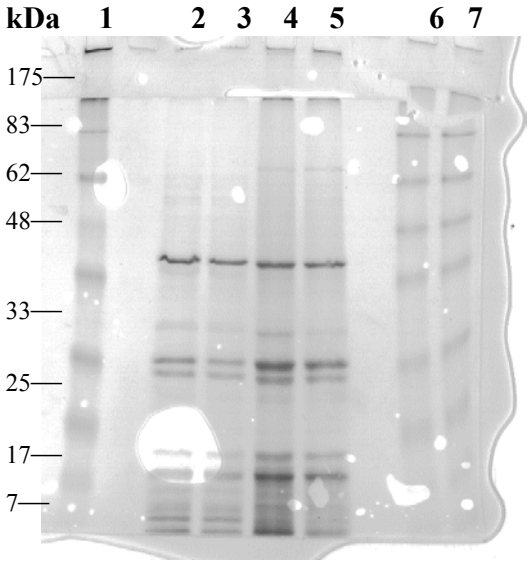


Figura 5.6. Gel de Eletroforese 10% SDS-PAGE de Amaranto. 1º , 6º e 7º perfil: mistura padrão de peso molecular; 2º perfil: farinha de amaranto integral; 3º perfil: farinha desengordurada de amaranto; 4º perfil: isolado protéico de amaranto; 5º perfil: isolado protéico de amaranto desengordurado.

Tabela 5.8 - Distribuição de Pesos Moleculares (kDa) na farinha de amaranto integral e desengordurada, e no isolado protéico de amaranto integral e desengordurado

Amaranto Integral	Amaranto Desengordurado	Isolado Integral	Isolado Desengordurado
86,5	86,6	92,3	93,3
67,3	68,6		
50,6	50,1	49,5	49,7
37,1	36,6	36,3	36,6
32,0	31,8	31,5	31,8
30,5	30,2	30,0	30,3
21,0	20,8	20,6	21,0
18,0	17,7	17,8	18,2
14,6	14,6	14	
8,7	8,7		9,3
6,7	6,9		6,7
4,9	5,0		5,1

No entanto, estas frações de baixo peso molecular voltam a estarem presentes no isolado protéico desengordurado com álcool etílico por Soxhlet, o que pode ser indicativo de um problema de concentração de amostra de isolado protéico integral ou oligomerização em função do solvente empregado.

SEGURA-NIETO *et al.* (1992) investigando o perfil eletroforético das frações protéicas do amaranto, apontam que as estas que continham unidades polipeptídicas com peso molecular acima de 60 kDa seriam a albumina e glutelina.

5.5 Perfil de Aminoácidos do Amaranto Integral e do Isolado Protéico de Amaranto Desengordurado

O perfil de aminoácidos da proteína do amaranto e do isolado protéico de amaranto desengordurado g/100g de amostra e g/100g de proteína, bem como as recomendações sobre aminoácidos essenciais da FAO/WHO (1991), estão apresentados nas Tabelas 5.9 e 5.10.

Os dados de perfil de aminoácidos do amaranto e isolado foram confrontados visando verificar a eficiência do processo de isolamento de proteína e possíveis alterações durante este processo. Esta análise objetivou também, estabelecer um fator de conversão nitrogênio para proteína, específico para as amostras que estão sendo estudadas, conforme recomendação da FAO (2001). Além

disso, com estas análises, verificou-se qual a relação lisina/arginina da proteína na farinha integral e no isolado incorporado nas rações, que é uma informação fundamental para o ensaio biológico planejado.

Tabela 5.9 - Perfil de aminoácidos do amaranto integral e do isolado protéico de amaranto desengordurado com álcool etílico, analisados pelo ITAL e Labtec. Dados são apresentados em g de aminoácido/100g de amostra.

	Amaranto Integral ITAL	IPA-Des* ITAL	IPA-Des* LABTEC	**Media para IPA* Desengordurado**
Ácido Aspártico	0,99 (±0)	7,36 (±0,25)	6,84	7,10 (±0,37)
Treonina	0,43 (±0,04)	3,32 (±0,08)	3,12	3,22 (±0,15)
Serina	0,76 (±0,03)	4,34 (±0,14)	4,07	4,07 (±0,39)
Ácido Glutâmico	2,23 (±0,12)	14,36 (±0,22)	15,30	14,83 (±0,67)
Prolina	0,54 (±0,10)	4,74 (±1,45)	4,13	4,43 (±0,43)
Glicina	1,07 (±0,06)	5,55 (±1,40)	4,66	5,10 (±0,63)
Alanina	0,52 (±0,06)	3,35 (±0,01)	3,55	3,45 (±0,14)
Cistina	0,24(±0,24)	1,65(±0,36)	1,36	1,50 (±0,21)
Valina	0,53 (±0,05)	3,75 (±0,16)	4,79	4,27 (±0,73)
Metionina	0,24 (±0,08)	2,20 (±0,07)	1,88	2,04 (±0,23)
Isoleucina	0,44 (±0)	3,47 (±0,01)	4,29	3,88 (±0,58)
Leucina	0,73 (±0,01)	5,68 (±0,22)	6,17	5,93 (±0,35)
Tirosina	0,40 (±0,06)	3,41 (±0,06)	3,15	3,28 (±0,18)
Fenilalanina	0,55 (±0,04)	4,17 (±0,12)	4,33	4,25 (±0,12)
Lisina	0,74 (±0,03)	4,23 (±0,07)	4,67	4,45 (±0,31)
Histidina	0,31 (±0,07)	2,09 (±0,23)	2,75	2,42 (±0,46)
Arginina	1,18 (±0,01)	8,54 (±0,01)	8,87	8,70 (±0,24)
Triptofano	0,26 (±0)	1,66	1,31	1,48 (±0,25)
Amônia	0,25 (±0,06)	1,26(±0,37)	Nd	1,26
Relação Lisina/Arginina	0,63 (±0,02)	0,50 (±0,01)	0,53	0,51 (±0,02)
Soma dos AA	12,10 (±0,14)	83,04 (±0,01)	84,96	84,00 (±1.36)

Valores são apresentados como média e entre parêntese está representado o desvio padrão, análises realizadas no ITAL foram em duplicata
*IPA Des: Isolado Protéico de Amaranto Desengordurado

Os valores médios da composição em aminoácidos obtidos no ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos (Campinas, Brasil) (duas determinações em

diferentes datas) e Labtec (Campinas, Brasil), para o isolado protéico de amaranto desengordurado, diferiram, principalmente, para triptofano, histidina, valina, isoleucina e cistina, apresentando coeficiente de variação de 17%, 19%, 17%, 15% e 14%, respectivamente. Em geral, a soma total de aminoácidos e a relação lisina/arginina, parâmetros importantes para este trabalho, nos resultados dos dois centros de análise apresentaram pequena diferença, com coeficiente de variação menor do que 5%.

A análise das proteínas pelo método da quantificação de nitrogênio de Kjeldahl, usa para conversão do nitrogênio em proteína o fator 6,25, baseado no fato de que em média proteínas contém 16% de nitrogênio. No entanto, este valor depende da composição de aminoácidos de cada proteína e da presença de outros compostos nitrogenados presentes na amostra e deve ser utilizado apenas quando estas informações não estão disponíveis (FUJIHARA *et al*. 2001).

Para efeito de cálculo do fator de conversão de nitrogênio para uma dada proteína deve-se dividir a somatória do peso dos aminoácidos presentes em 100g da amostra pelo teor de nitrogênio determinado na mesma amostra. Não se deve somar o teor de amônia determinado na análise de aminoácidos (MOSSE 1990). Para o IPA desengordurado, no ITAL o resultado para teor de nitrogênio foi de 13,90%; dividindo-se por 83,04 que é a media da somatória dos aminoácidos determinados no ITAL por 13,90, tem-se 5,97 como fator de conversão de nitrogênio para proteína. No Labtec a somatória foi de 84,96 e o teor de nitrogênio foi de 13,58%, o que gera um fator de 6,27. A média destes dois fatores para o IPA desengordurado é de **6,12**.

Para farinha de amaranto integral obteve-se o fator de **5,30**, dividindo a somatória dos aminoácidos da farinha que é 12,1, pelo teor de nitrogênio obtido na análise de Kjeldhal, 2,28%. SALO-VAANAMEN e KOIVISTOINEN (1996), estudando 148 tipos de alimentos, verificaram através de análise de regressão, que um fator geral de 5,33 para os vários grupos de alimentos faz com que o valor da proteína bruta (determinado via micro-Kjedahl) ficasse próximo aos valores da proteína verdadeira (obtido pela soma de aminoácidos). A FAO/WHO (2001) recomenda, para alimentos de origem vegetal, fatores que estão na faixa de 5,7 a 6,25.

DUARTE-CORREA *et al*. (1986) calcularam fator de conversão nitrogênio para proteína do grão integral de *Amaranthus cruentus* cultivado em Belo Horizonte (Brasil), e encontraram o valor de 6,02, no entanto, os valores de metionina e cisteína deste trabalho podem ter sido subestimados. BECKER *et al*. (1981), SALCEDO-CHÁVEZ *et al.* (2002), SCILINGO *et al*. (2002) citam o fator 5,85 para esta espécie de amaranto. ROBINSON (1992) calculou o fator de conversão para *Amaranthus cruentus* cultivado nos Estados Unidos, como sendo 5,9 se não se adicionasse amônia no cálculo.

Comparando a relação lisina/arginina da proteína do amaranto integral (0,63) e do IPA (0,51) tem-se uma alteração deste fator, indicando que houve exclusão seletiva de alguns componentes protéicos específicos durante a preparação do isolado protéico.

Um dos efeitos deletérios do processo de isolamento da proteína é a degradação de aminoácidos. Uma destas degradações é conhecida com beta-

eliminação, que é facilitada em pH alcalino (acima de 8,5) e calor (principalmente acima de 50°C). Esta reação inicia-se por um ataque nucleofílico ao carbono alfa, principalmente do aminoácido cisteína (a serina, fosfoserina e treonina também podem ser degradadas) formando dehidroalanina. Este composto é extremamente reativo e pode combinar-se com a lisina formando o complexo lisinoalanina, e se reagir com cisteína formando lantionina. Isto ocasiona perdas nutricionais e alteração de digestibilidade da proteína (DAMODARAN 1997; SKORDSKI 2001). SARWAR *et al.* (1999) relatam que a formação de lisinoalanina foi acompanhada da perda de cistina (73-77%), treonina (35-45%), serina (18-30%) e lisina (19-20%) em isolados protéicos produzidos por extração alcalina em temperatura de 75°C. Ao se comparar os dados de composição de aminoácidos do amaranto integral e seu isolado (Tabela 5.10), percebe-se alteração no conteúdo de lisina, mas não marcadamente da cisteína, indicando que a reação de beta-eliminação não ocorreu de forma importante. O fato de o isolado protéico ter sido processado em temperaturas sempre inferiores a 30°C, corrobora esta observação.

LINDEBOON (2005) também encontrou significante perda de lisina durante a produção de isolado protéico de quinoa, e de forma semelhante para o isolamento da proteína por precipitação isoelétrica ou por ultracentrifugação.

A perda da lisina pode ter ocorrido também durante o processo de desengorduramento do isolado protéico. O isolado foi desengordurado com álcool etílico, é esperada uma perda da fração prolamina (álcool solúvel). Baseando-se em relatos de BRESSANI e GARCIA-VELA (1990), que analisaram o perfil de aminoácidos de cada uma das frações da proteína do amaranto, verificou-se que a relação lisina/arginina era maior (0,83) na fração prolamina e albumina (1,08),

quando comparada à globulina (0,48) e glutelina (0,68). É provável, que a perda seletiva de frações protéicas ricas em lisina ou maior eficiência na extração das globulinas tenham alterado a relação lisina/arginina no presente trabalho. Uma investigação mais aprofundada seria necessária, no entanto, para uma resposta conclusiva.

Os aminoácidos lisina e metionina são tidos como capazes de induzir hipercolesterolemia em coelho, ao passo que a arginina comprovadamente é capaz de induzir a redução do colesterol (SUGANO *et al*. 1982; KUROWSKA *et al*. 1990; KUROWSKA *et al*. 1993; GIROUX *et al*. 1999). SANCHEZ *et al.* (1988) sugerem que a relação lisina/arginina é importante para este efeito, e quanto menor este coeficiente menor será a colesterolemia. GORINSTEIN *et al.* (2001) determinaram o perfil de aminoácidos de amaranto (*A hypochondriacus*) e da soja cultivada no Brasil e verificaram que a relação lisina/arginina foi de 0,51 e 0,63, respectivamente. SANCHEZ *et al.* (1988) obtiveram para esta relação 0,9 para proteína de soja e 2,2 para a caseína, uma proteína reconhecida como hipercolesterolemizante em coelhos.

O escore químico da leucina determinado no presente trabalho indica que este é o aminoácido limitante do amaranto estudado, em concordância com SINGHAL e KULKAMI (1988), DUARTE-CORREA *et al*. (1986) e BECKER (1981). BRESSANI *et al* (1989) sugerem que embora o escore químico a leucina no amaranto indique ser este o aminoácido limitante, experimentos biológicos em ratos mostram a treonina como primeiro aminoácido limitante. Esta hipótese foi refutada por GRAHAM *et al.* (1990), que concluiu ser a leucina o primeiro aminoácido limitante.

Tabela 5.10 - Perfil de aminoácidos do amaranto integral, isolado protéico de amaranto desengordurado e recomendações de aminoácidos essenciais da FAO/WHO (1991). Dados são apresentados em g de aminoácido/100g de proteína.

	Amaranto Integral BRS-Alegria (1)	**IPA Des (2)**	Duarte-Correa (1986)	Bressani e Garcia-Vela (1990)	FAO/WHO (1991) (3)
Ácido Aspártico	8,3 (±0,12)	8,5 (±0,60)	8,0	12,0	
Treonina	3,6 (±0,37)	3,8 (±0,25)	4,5	3,9	3,4
Serina	6,4 (±0,18)	4,9 (±0,55)	7,9	5,4	
Ácido Glutâmico	18,6 (±0,77)	17,7 (±0,46)	17,1	21,7	
Prolina	4,5 (±0,76)	5,3 (±0,61)	4,5	6,7	
Glicina	9,0 (±0,38)	6,1 (±0,87)	8,3	9,9	
Alanina	4,3 (±0,46)	4,1 (±0,09)	3,6	8,5	
Cistina	2,0 (±0,82)	1,8 (±0,29)	2,0	Nd	*
Valina	4,4 (±0,44)	5,1 (±0,77)	4,8	5,4	3,5
Metionina	2,0 (±0,70)	2,4 (±0,32)	1,7	3,0	2,5 (Met+Cys)
Isoleucina	3,7 (±0,07)	4,6 (±0,60)	4,2	3,1	2,8
Leucina	**6,1** (±0,03)	7,1 (±0,29)	7,0	6,0	6,6
Tirosina	3,3 (±0,46)	3,9 (±0,29)	4,4	4,9	**
Fenilalanina	4,6 (±0,31)	5,1 (±0,04)	4,7	5,3	6,3 (Phe+Tyr)
Lisina	6,2 (±0,14)	5,3 (±0,27)	6,2	7,4	5,8
Histidina	2,6 (±0,55)	2,9 (±0,50)	2,7	4,7	1,9
Arginina	9,8 (±0,04)	10,4 (±0,09)	7,9	10,5	
Triptofano	2,2 (±0,0)	1,8 (±0,33)	1,4	1,4	1,1
Amônia	2,4 (±0,06)	Nd	Nd	Nd	
Relação Lisina/Arginina	0,63 (±0,02)	0,51 (±0,02)	0,78	0,70	

(1) analisado no ITAL; (2) Isolado Protéico de Amaranto Desengordurado, media das determinações no ITAL e LABTEC; (3) Recomendação da FAO/WHO para pré-escolares

* valor da recomendação expresso junto à Metionina; ** valor da recomendação expresso junto à Fenilalanina.

Valores são apresentados como média e entre parêntese está representado o desvio padrão

5.6 Perfil de Ácidos Graxos e Esqualeno da Farinha de Amaranto e Isolado Protéico de Amaranto

Os dados obtidos (em triplicata) para o perfil de ácidos graxos estão representados abaixo e comparados com dados de literatura (Tabela 5.11 e Figura 5.7). A princípio, foi encontrado um alto teor de ácido erúcico (C22:1), um componente tóxico, presente no óleo de colza. O FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos estabeleceu o limite de 2% de ácido erúcico em óleos comestíveis, pois em níveis maiores que este estaria associado a lesões cardíacas.

Tabela 5.11 - Principais ácidos graxos do amaranto BRS-Alegria (com e sem o ácido erúcico) e dados de literatura (valores expressos em porcentagem).

Acido Graxo		**A.cruentus BRS-Alegria**	**A cruentus BRS-Alegria (sem erúcico)**	*A.cruentus (EUA)* (1)	A.cruentus (Chile)(2)	A cruentus (El Salvador) (3)	A.cruentus (vários países) (4)
Palmítico	**C 16:0**	**16,5** (±0,6)	**19,2** (±1,0)	18,5	19,3	17-21,4	19,5-23,4
Esteárico	**C 18:0**	**3,2** (±0,2)	**3,7** (±0,1)	3,3	3,3	3-3,8	0-0,9
Oléico	**C 18:1**	**30,5** (±2,9)	**35,2** (±0,2)	34,2	34,1	20,3-32	30,1-38,9
Linoleico	**C 18:2**	**35,0** (±3,6)	**40,5** (±0,6)	32,5	37,2	33,6-43,9	36,7-46,4
γ-Linolênico(ω-6) C18:3		**0,6** (±0,2)	0,7 (±0,2)	0,4	0,9	--	Traços
α-Linolênico(ω-3) C18:3		**0,7** (±0,3)	0,8 (±0,4)	0,4	1,1	--	Traços
Erúcico	**C 22:1**	**13,4** (±8,0)	--	10,0	--	--	---

(1) Yanez *et al.*(1994) (2) Becker *et al*. (1981) (3) Berganza et al. (2003) (4)He *et al.* (2002)
Valores são apresentados como média e entre parêntese está representado o desvio padrão

YANEZ *et al*. (1994) relatam que dos ácidos graxos presentes no óleo de amaranto (*A. cruentus*) 8 a 10% referem-se ao ácido docosaenóico. Ácido 13-docosaenóico é o nome sistemático do ácido erúcico, ou seja, é um ácido graxo de 22 átomos de carbono com uma insaturação em *cis* na nona posição (USDA, 2004). No entanto, outros autores que investigaram o perfil de ácidos graxos do amaranto não relatam a presença do ácido erúcico (BECKER *et al.* 1981; BERGER *et al*. 2003; LEON-CAMACHO *et al*. 2001). Digno de nota, é que estes trabalhos pesquisaram a presença de esqualeno.

Ao investigar a presença de esqualeno nas amostras, verificou-se que o padrão de esqualeno (Tempo de Retenção 24,86-24,96 min) (Figura 5.8) apresentava o mesmo tempo de retenção que o padrão de ácido erúcico (24,96 min).

RUIZ-GUTIERREZ *et al.* (2001) relatam que em muitos trabalhos, por deficiências metodológicas o esqualeno é confundido com o ácido docosaenóico, e sugere o uso de cromatógrafo gasoso acoplado com espectrômetro de massas para a identificação inequívoca destes componentes. No presente trabalho, baseando-se na literatura, este pico passa a ser considerado como referente ao esqualeno. Futuras análises em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (RUIZ-GUTIERREZ *et al*. 2001) ou por cromatografia líquida de alta eficiência (HE *et al*. 2002) esclarecerão este ponto de forma definitiva, em futuros trabalhos.

Na literatura encontramos diversas referências à presença do esqualeno no amaranto. HE *et al*. (2002) relatam a presença de 7,7% de esqualeno no óleo de amaranto (*A cruentus*), SALA *et al*. (1998) *apud* LEON-CAMACHO *et al*. (2001) referem uma quantia de 6 a 8% de esqualeno, ao passo que LEON-CAMACHO *et al.*

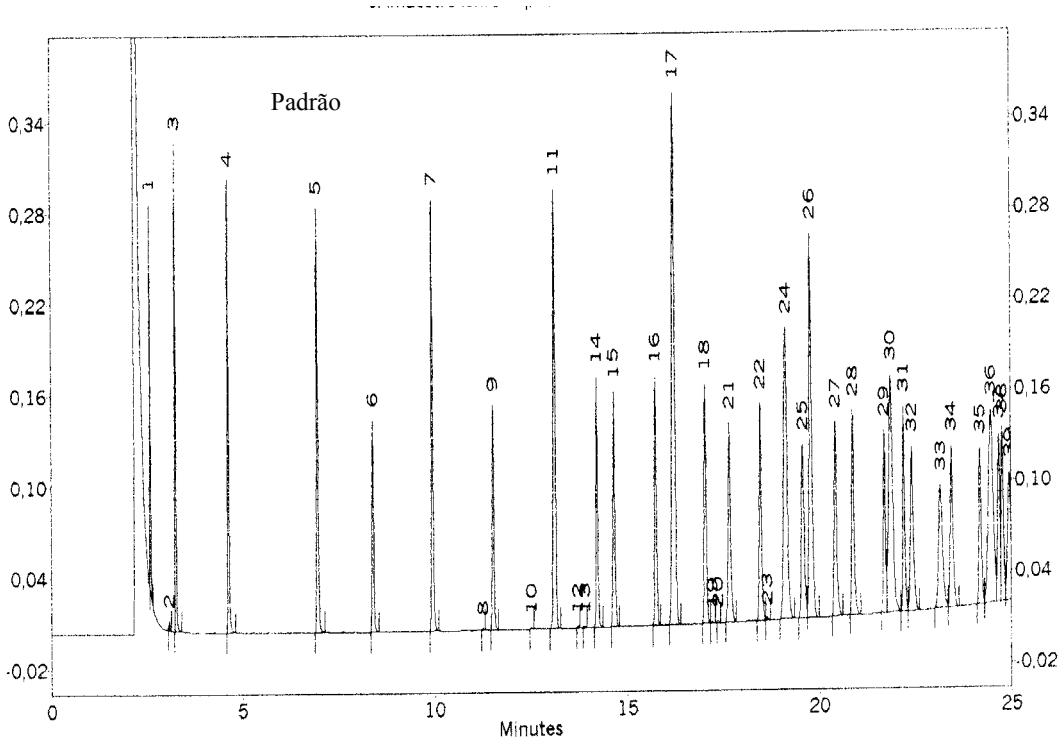
(2001) encontraram 3,5 a 8,2% em sementes cultivadas no Equador e Itália, variando conforme o método de extração. BERGER *et al.* (2003a) caracterizaram o óleo de amaranto extraído através de soxhlet, e encontrou 6,8% de esqualeno.

Se toda a área detectada em 24,96 minutos corresponder ao esqualeno, as leituras de diferentes extrações do óleo de amaranto apresentaram valor em média de área do pico de 133.910 ± 25.770 (média de quatro determinações). Ao aplicar-se este valor à equação da reta obtida para a curva-padrão do esqualeno e considerando-se os procedimentos de extração, obtém-se o valor de 6,07g/100g de óleo de amaranto, que está de acordo com a literatura.

O isolado protéico de amaranto integral gerou leitura de 13.425, o que corresponderia a 0,48g esqualeno/100g de óleo. O isolado ainda foi submetido a mais uma etapa de desengorduramento, que reduz ainda mais o teor deste componente. Ou seja, este componente não estará presente em quantidade importante o suficiente para influenciar no perfil lipídico dos animais. SMITH *et al.* (2000) citaram que seria necessária a presença de esqualeno em quantidade equivalente a 1% da ração para que os seus efeitos possam exercer efeito sobre o metabolismo lipídico de hamsters.

Vale ressaltar também, que estes valores foram investigativos, uma vez que este componente não era foco do trabalho e, portanto, não foram realizados testes de recuperação por contaminação com padrão.

O objetivo destas análises foi apenas verificar a queda do componente esqualeno durante a obtenção do isolado protéico, de forma a garantir que este não estaria presente em quantidades que pudessem influenciar de forma relevante o metabolismo lipídico dos animais.



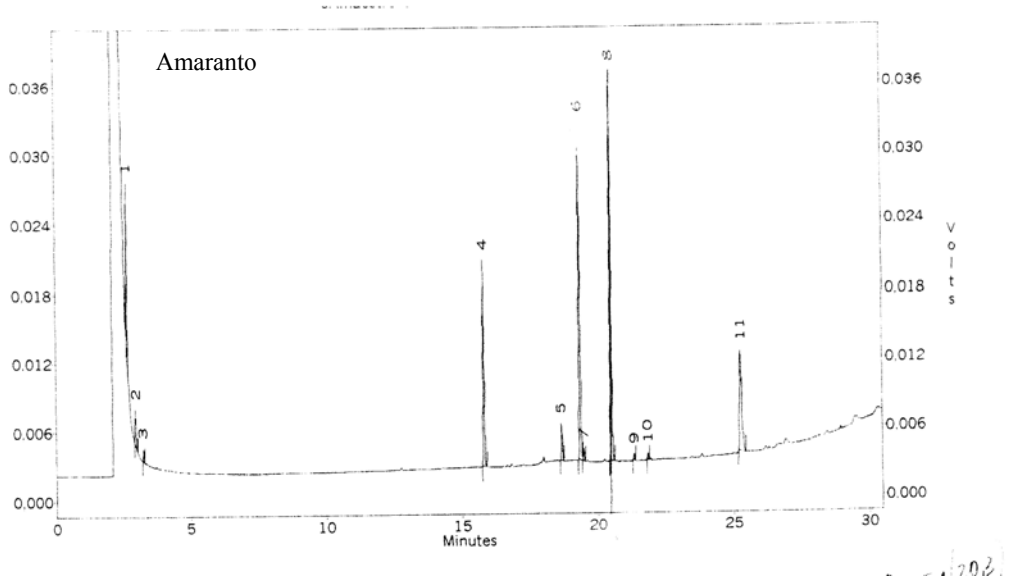


Figura 5.7. Cromatogramas das análises de ácidos graxos: padrão e amaranto. No cromatograma do amaranto os principais ácidos graxos apontados, estão representados nos picos: 4 (palmítico), 5(esteárico), 6 (oléico), 8 (linoléico), 9 (γ-Linolênico), 10 (α-Linolênico), 11 (erúcico ou esqualeno?).

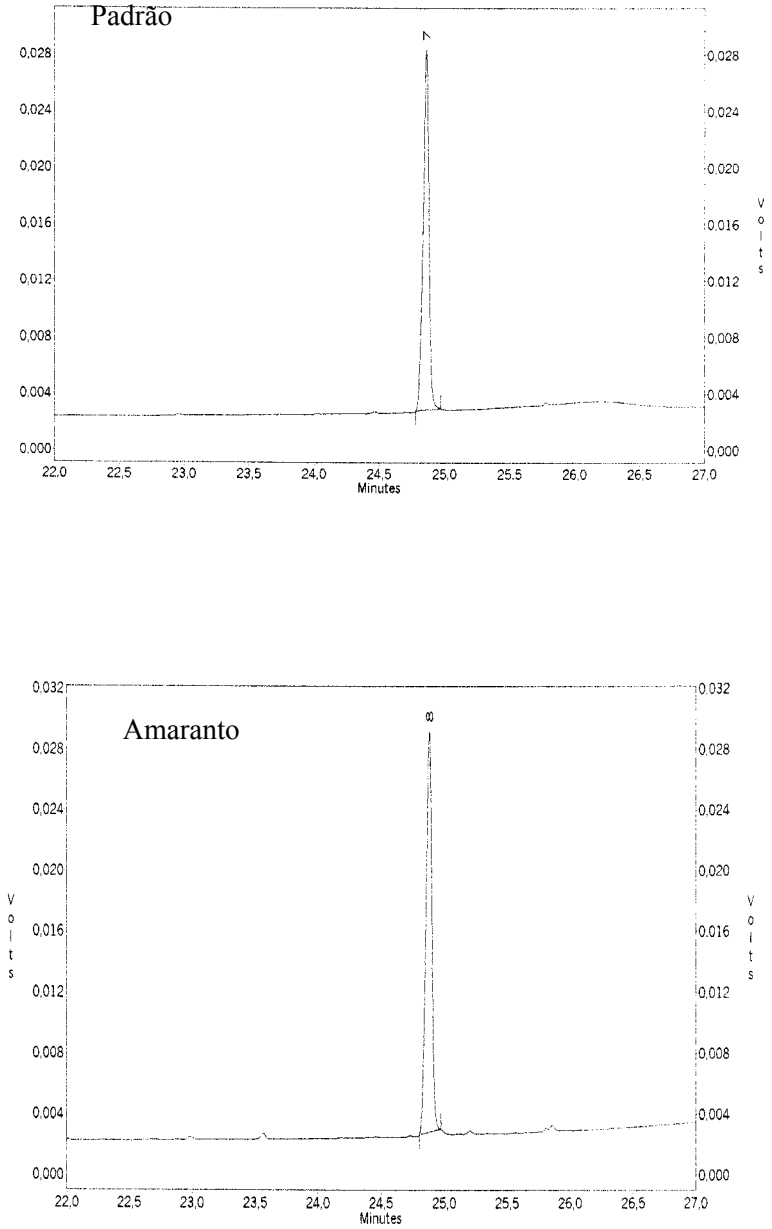


Figura 5.8. Cromatograma das análises de esqualeno: padrão e amaranto

5.7 Composição das Rações Utilizadas no Experimento com Animais

5.7.1 Dieta Experimento Piloto

Os resultados de cinzas, umidade e lipídeos referem-se a determinações em triplicata. As análises de proteína foram repetidas 5 vezes, e os de colesterol foram resultados de três determinações realizadas em três extrações da matriz (Tabela 5.12)

Tabela 5.12 Composição (base seca) de rações utilizadas no experimento Piloto, representado em g/100g de dieta.

	Dieta Caseína	*Dieta Colesterol*	*Dieta Saturados*
Umidade	7.1 (±0.3)	7.0 (±0.2)	7.0 (±0.2)
Proteína*	32.0 (±1.4)	19.3 (±0.7)	18.2 (±0.8)
Lipídeos	15.6 (±0.2)	15.8 (±0.2)	16.2 (±0.1)
Cinzas	2.0 (±0.04)	1.8 (±0.02)	2.0 (±0.03)
Carboidratos**	50.4	63.1	63.7
Colesterol	0.05 (±0.008)	0.22 (±0.051)	0.04 (±0.006)

*Nx6,25 **calculado pela diferença (inclui fibras)
Valores são apresentados como média e entre parêntese está representado o desvio padrão

A composição centesimal e perfil de ácidos graxos (Tabela 5.13) estão de acordo com o planejado (Tabela 4.2).

Tabela 5.13 - Perfil de ácidos graxos das rações utilizadas no experimento Piloto (valores expressos em %).

Ácidos Graxos	Dieta Colesterol	Dieta Caseína	Dieta Saturados
Total Saturados	*40,5 (±0,6)*	*39,3 (±1,5)*	*75,8 (±11)*
Total Monoinsaturados	*27,8 (±0)*	*25,6 (±4,9)*	*13,3 (±2,8)*
Total Polinsaturados	*31,8 (±0,6)*	*35,0 (±6,2)*	*11,0 (±8,2)*

5.7.2 Dieta Experimento Principal e Experimento Aminoácidos

Os resultados de cinzas, umidade, proteínas e lipídeos (Tabela 5.14) e perfil de ácidos graxos (Tabela 5.15) para as dietas do experimento Principal referem-se a determinações em triplicata

Tabela 5.14 - Composição (base seca) de rações utilizadas no experimento Principal, representado em g/100g de dieta.

	Dieta Hiper (a)	***Dieta Controle***	***Dieta AM (b)***	***Dieta CAS+AM(c)***	***Dieta Aproteíca***
Umidade	6.2 (±0.1)	6.5 (±0.4)	11.5 (±0.3)	4.6 (±0.3)	4.8 (±0.3)
Proteína*	31.9 (±0.4)	18.5 (±0.2)	20.5 (±0.8)	29.7 (±0.8)	0.3 (±0.01)
Lipídeos	15.8 (±0.1)	16.2 (±0.3)	15.3 (±0.1)	15.2 (±0.2)	15.7 (±0.2)
Cinzas	3.0 (±0.06)	2.5 (±0.06)	2.7 (±0.08)	2.9 (±0.06)	2.5 (±0.02)
Carboidratos**	49.3	62.8	61.5	52.2	81.5
Colesterol	0.07 (±0.006)	0.07 (±0.008)	0.06 (±0.008)	0.07 (±0.011)	0.09 (±0.013)

*Nx6,25 **calculado pela diferença (inclui fibras)
(a) HIPER = hipercolesterolemizante; (b) AM= isolado protéico de amaranto (c) CAS+AM= caseína + isolado protéico de amaranto
Valores são apresentados como média(n=3) e entre parêntese esta representado o desvio padrão

Tabela 5.15 - Perfil dos principais ácidos graxos das rações utilizadas no experimento Principal (valores expressos em %).

Ácidos Graxos	**Dieta Hiper**	**Dieta Controle**	**Dieta CAS+AM**	**Dieta AM**
Total Saturados	*44,1 (±7,6)*	*45,0 (±2,9)*	*44,2 (±2,4)*	*43,2 (±2,9)*
Total Monoinsaturados	*27,3 (±1,2)*	*26,9 (±1,8)*	*26,0 (±1,6)*	*25,9 (±1,7)*
Total Polinsaturados	*28,7 (±6,4)*	*28,1 (±1,1)*	*29,8 (±0,8)*	*30,9 (±1,3)*

(a) HIPER = hipercolesterolemizante; (b) AM= isolado protéico de amaranto (c) CAS+AM= caseína + isolado protéico de amaranto
Valores são apresentados como média(n=3) e entre parêntese esta representado o desvio padrão

As rações apresentaram composição conforme o previsto, com teor de colesterol e lipídeos bastante semelhantes, o que possibilita avaliar exclusivamente o efeito do teor e qualidade da proteína presente em cada uma das rações.

Os resultados de cinzas, umidade, proteínas e lipídeos (Tabela 5.16) e perfil de ácidos graxos (Tabela 5.17) para as dietas do experimento Aminoácidos.

Tabela 5.16 - Composição (base seca) de rações utilizadas no experimento Aminoácidos, representado em g/100g de dieta.

	Dieta Hiper (a)	***Dieta Controle***	***Dieta AA CAS (b)***	***Dieta CAS+ ARG (c)***	***Dieta AA AM (d)***
Umidade	7.7 (±0.25)	6.7 (±0.2)	5.2 (±0.24)	6.6 (±0.20)	6.1 (±0.07)
Proteína*	32.6 (±0.14)	18.5 (±0.39)	19.8 (±0.44)	22.8 (±0.8)	23.5 (±0.02)
Lipídeos	16.1 (±0.05)	17.3 (±0.07)	15.6 (±0.13)	16.3 (±0.09)	14.8 (±2.14)
Cinzas	3.2 (±0.09)	2.9 (±0.06)	3.9 (±0.06)	3.7 (±0.05)	4.0 (±0.06)
Carboidratos**	48.1	61.3	52.3	57.2	60.9
Colesterol	0.07 (±0.006)	0.07 (±0.006)	0.04 (±0.008)	0.05 (±0.012)	0.06 (±0.017)

*Nx6,25 **calculado pela diferença (inclui fibras)
(a) HIPER = hipercolesterolemizante; (b) AA CAS = mistura de aminoácido que simula 20% de caseína; (c) CAS+ARG = 20% de caseína + arginina; (d) AA AM= mistura de aminoácidos que simula 20% de isolado protéico de amaranto
Valores são apresentados como média(n=3) e entre parêntese esta representado o desvio padrão

Tabela 5.17 - Perfil dos principais ácidos graxos das rações utilizadas no experimento aminoácidos (valores expressos em %).

Ácidos Graxos	**Dieta Hiper**	**Dieta Controle**	**Dieta CAS+ARG**	**Dieta AA CAS**	**Dieta AA AM**
Total Saturados	*47,9 (±1,6)*	*41,9 (±3,6)*	*42,9 (±5,9)*	*39,4 (±2,4)*	*40,4 (±3,2)*
Total Monoinsaturados	*25,2 (±1,5)*	*34,1 (±3,7)*	*30,2 (±0,8)*	*29,8 (±2,7)*	*27,3 (±4,0)*
Total Polinsaturados	*27,0 (±0,9)*	*24,0 (±6,0)*	*26,9 (±6,8)*	*30,8 (±2,5)*	*32,3 (±1,9)*

a) HIPER = hipercolesterolemizante; (b) AA CAS = mistura de aminoácido que simula 20% de caseína; (c) CAS+ARG = 20% de caseína + arginina; (d) AA AM= mistura de aminoácidos que simula 20% de isolado protéico de amaranto

Valores são apresentados como média(n=3) e entre parêntese esta representado o desvio padrão

A dieta controle utilizada no experimento aminoácidos tem teor de lipídeos ligeiramente superior ao das outras rações. A dieta aminoácidos do amaranto por sua vez, tem o teor de proteína um pouco superior ao esperado. No entanto, o perfil de aminoácidos está bastante próximo à formulação teórica, conforme apresentado na Tabela 5.18.

Tabela 5.18 - Perfil de aminoácidos das rações aminoácidos do amaranto e aminoácidos da caseína. Dados são apresentados em g de aminoácido/100g de proteína.

Aminoácido	**AA CAS[(a)]**		**AA AM[(b)]**	
	Encomendado	**Determinado**	**Encomendado**	**Determinado**
Ácido Aspártico	6,5	6,0	8,2	8,1
Treonina	3,9	3,7	3,7	3,7
Serina	5,6	5,7	4,7	5,1
Ácido Glutâmico	20,8	26,3	16,6	20,7
Prolina	12,1	10,1	5,2	4,3
Glicina	1,7	1,6	6,0	6,2
Alanina	2,8	2,5	3,9	3,5
Cistina	0,4	0,3	1,8	1,3
Valina	5,6	5,8	4,6	4,5
Metionina	2,5	2,3	2,4	2,3
Isoleucina	4,8	4,6	4,2	3,8
Leucina	8,8	8,7	6,6	6,3
Tirosina	5,1	4,2	3,8	3,1
Triptofano	1,7*	2,0	1,7	1,7
Fenilalanina	4,8	4,5	4,8	4,5
Lisina	7,4	6,5	4,9	5,4
Histidina	2,5	2,3	2,6	3,2
Arginina	3,6	3,3	9,8	12,5
Relação Lisina/Arginina	**2,05**	**1,99**	**0,50**	**0,43**

(a) AA CAS = mistura de aminoácido que simula 20% de caseína (b) AA AM= mistura de aminoácidos que simula 20% de isolado protéico de amaranto

Para efeito de comparação dos teores de proteínas, nas diferentes dietas, foi construída a Tabela 5.19. Os teores de proteína nas dietas estão apresentados em base úmida, pois mais se aproxima da forma que eram consumidas.

Tabela 5.19 - Teor de proteína de dietas (base úmida*)* utilizadas nos experimentos Piloto, Principal e Aminoácidos representado em g/100g de dieta.

Dieta	***Teor de Proteína (g/100g de amostra)***
Experimento Piloto	
Dieta Caseína	29,9 (±1,27)
Dieta Colesterol	18,0 (±0,67)
Dieta Saturados	17,0 (±0,74)
Experimento Principal	
Dieta Hipercolesterolemizante	29,2 (±0,44)
Dieta Controle	17,3 (±0,20)
Dieta Amaranto	18,3 (±0,31)
Dieta Caseína + Amaranto	28,3 (±0,80)
Dieta Aminoácidos do Amaranto	17,1 (±0,10)
Dieta Aprotéica	0,3 (±0,01)
Experimento Aminoácidos	
Dieta Hipercolesterolemizante	30,1 (±0,13)
Dieta Controle	17,2 (±0,38)
Dieta Aminoácidos da Caseína	19,0 (±0,41)
Dieta Caseína + Arginina	21,4 (±0,24)
Dieta Aminoácidos do Amaranto	21,6 (±0,02)

Valores são apresentados como média(n=5) e entre parêntese esta representado o desvio padrão

5.8 Resultados do Experimento Piloto

O consumo de dieta, ingestão total durante 3 semanas, consumo diário médio e coeficiente de eficácia alimentar obtido ao final de 3 semanas de ingestão da dieta experimental é apresentado na Tabela 5.20. Estes mesmos parâmetros relativos ao período final (após 5 semanas de ingestão) são apresentados na Tabela 5.21.

Tabela 5.20 - Consumo diário de dieta e consumo total nas 3 semanas, ganho de peso e coeficiente de eficácia alimentar para hamsters alimentados com diferentes dietas no experimento Piloto (após 3 semanas)

	Dieta Caseína	Dieta Colesterol	Dieta Saturados
Peso Ganho (g)	31,85 (±10,19)	34,86 (±3,10)	33,22 (±6.85)
Ingestão de Dieta (g)	106,07 (±7,09)	116,40 (±2,52)	116,33 (±24,34)
Consumo Diário Médio (g)	4,82 (±1,34)	5,29 (±1.27)	5,30 (±1.85)
CEA(%)	29,88 (±8,33)	29,92 (±2,04)	28,62 (±2,44)

CEA: Coeficiente de eficácia alimentar= peso ganho/ingestão de alimentos x100
Valores são apresentados como média(n=3 animais/grupo) e entre parêntese esta representado o desvio padrão

Tabela 5.21 - Média de consumo diário de dieta e consumo total nas 5 semanas, ganho de peso e coeficinte de eficácia alimentar para hamsters alimentados com diferentes dietas no experimento piloto (após 5 semanas)

	Caseína	Colesterol	Saturados
Peso Ganho (g)	33,85 b (±2,86)	37,03 ab (±3,75)	48,17 a (±3,62)
Ingestão de Dieta (g)	156,73 (±13,33)	155,59 (±7,34)	182,40 (±17,72)
Consumo Diário Médio (g)	4,65 (±1,55)	4,81 (±1,49)	5,05 (±1,90)
CEA(%)	21,62 (±1,15)	23,77 (±1,29)	26,63 (±4,57)

CEA: Coeficiente de eficácia alimentar= peso ganho/ingestão de alimentos x100
Valores são apresentados como média(n=3 animais/grupo) e entre parêntese esta representado o desvio padrão
As médias em mesma linha, seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si através de Teste de Tukey (Assistat 7.3 Beta) ($p<0.05$)

Apesar do peso dos animais dos diferentes grupos (Caseína e Saturados) diferirem ao final do período de 5 semanas, o mesmo não foi observado na terceira semana. Isso refletiu o consumo maior ao longo de todo período dos animais da dieta saturada, embora a ingestão total da dieta não tenha apresentado diferença estatisticamente significativa.

Notou-se que os animais têm tendência a rejeitarem as dietas experimentais se as mesmas não forem repostas todos os dias.

Os resultados do perfil lipídico ao longo de 3 e 5 semanas de consumo das diferentes dietas hipercolesterolemizantes estão apresentados na Tabela 5.22.

Segundo laudo clínico de análises laboratoriais emitido pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP para hamsters, os valores de referência de colesterol total variam de 40 a 94 mg/dL e o de triglicérides de 125 a 214mg/dL. Os valores para triglicérides obtidos no presente experimento foram bastante inferiores quando comparados a este laudo. NISTOR *et al*. (1987) referem o teor de colesterol total normal em hamster como sendo de 38 a 114 mg/dL (media de 64mg/dL), o de HDL como em média 36mg/dL e o de LDL-C como 26 mg/dL.

NISTOR *et al*. (1987) relatam que o colesterol total de hamsters alterou-se apenas após 2 a 3 semanas da ingestão de dieta contendo altos teores de colesterol (3%), e que o aumento foi de aproximadamente 4 vezes após a quarta semana com a dieta.

Tabela 5.22 - Perfil lipídico plasmático dos hamsters do ensaio Piloto.

		Caseína		**Colesterol**		**Saturados**	
	Basal	**3 sem**	**5 sem**	**3 sem**	**5 sem**	**3 sem**	**5 sem**
Colesterol Total (mg/dL)	43,7b (±8,4)	149,6ac (±38,2)	146ac (±32,3)	110,3a (±14,1)	146,1c (±5,1)	116,8ac (±17,4)	127,2ac (± 11,0)
Triglicérides (mg/dL)	50,6a (±9,5)	81,6ab (±30,0)	73,8ab (±32,0)	104,3b (±23,2)	74,4ab (±7,3)	116,6b (±28,4)	83,7ab (±60,3)
HDL-C (mg/dL)	27,1b (±0,8)	48,0a (±10,5)	46,3a (±6,0)	61,8a (±12,8)	69,3a (±3,7)	66,9a (±10,8)	59,7a (±8,6)
VLDL-C (mg/dL)	10,1a (±1,9)	16,3ab (±6,0)	14,8ab (±6,4)	20,9b (±4,6)	14,9ab (±1,5)	22,3b (±5,7)	16,7ab (±5,4)
LDL-C (mg/dL)	10,9a (±3,1)	85,3b (±32,3)	84,9b (±32,6)	27,6ac (±10,2)	62,0b (±10,0)	27,5ac (±10,9)	56,2bc (±2,0)
VLDL+LDL-C (mg/dL)	21,0a (±4,1)	101,6c (±27,9)	99,7c (±26,7)	48,5b (±10,3)	76,9bc (±8,8)	49,8b (±14,0)	67,6bc (±2,5)

Valores são apresentados como média (n=3animais/grupo) e entre parêntese esta representado o desvio padrão
As médias em mesma linha, seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si através de Teste de Tukey (Assistat 7.3 Beta) ($p<0.05$)

Para colesterol total sérico observou-se que o aumento obtido em relação ao início do experimento, já nas três primeiras semanas de dieta, foi significativo, sendo que apenas na dieta colesterol é que houve incremento significativamente diferente entre a terceira e quinta semana de dieta. Isto significa que para qualquer uma das rações, 3 semanas já é tempo suficiente para se ter um aumento dos níveis de colesterol de 2 a 3 vezes em relação ao valor basal. Não houve diferença significativa em relação às 3 dietas neste período, o que sugere que a dieta rica em

caseína pode ser tão eficiente, quanto às outras geralmente utilizadas em experimentos de indução de hipercolesterolemia.

O aumento de triglicérides ocorreu, principalmente, com as rações ricas em colesterol e com alto teor de ácidos graxos saturados, e não tão marcadamente na dieta rica em caseína. Os resultados de triglicérides tiveram coeficiente de variação alto, indicando uma grande variabilidade individual de respostas às dietas oferecidas.

Em relação às frações de colesterol, optou-se por representar a soma das lipoproteínas VLDL-C+LDL-C, o que alguns autores preferem chamar de Colesterol não-HDL, uma vez que ambas são calculadas a partir da fórmula de Friedwald, e com isso reduziram-se os coeficientes de variação para estes dados. O aumento nestas frações, geralmente tido como indesejável para a manutenção da saúde, foi percebido em todas as rações, sendo maior na dieta rica em caseína.

O valor de HDL-C teve aumento similar em todas as rações experimentadas.

As Figuras 5.9 a 5.12 representam graficamente os dados apresentados na Tabela 5.22, de forma a facilitar a visualização. Nestas figuras também foram incluídos os dados referentes às três semanas que os animais voltaram a se alimentar com ração comercial (após as cinco semanas com a dieta experimental), mostrando que o aumento de triglicérides, colesterol e suas frações não se deveu ao envelhecimento dos animais, uma vez que quando eles voltam a se alimentar com dietas equilibradas, todos os valores destes parâmetros plasmáticos voltam a cair.

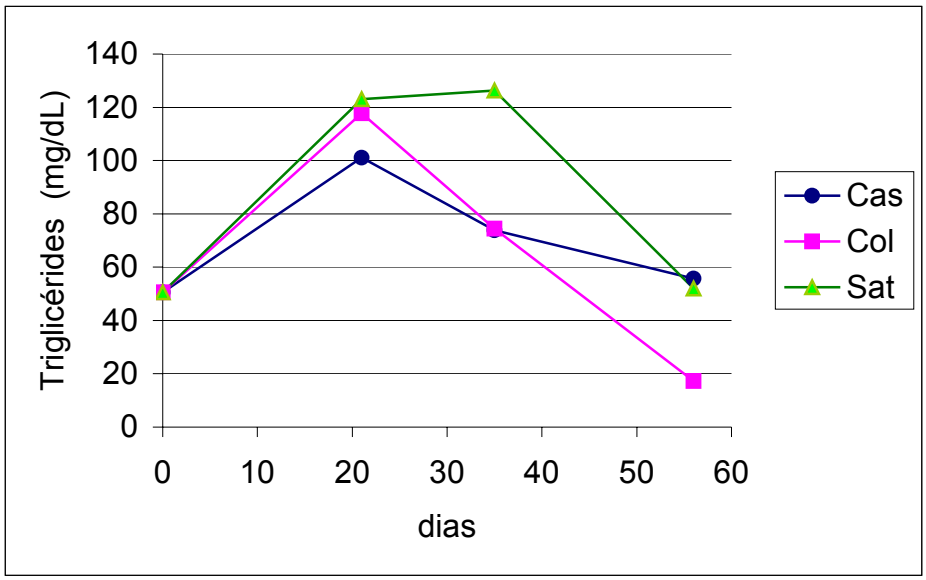


Figura 5.9. Concentração de triglicérides no plasma de hamsters do experimento Piloto.

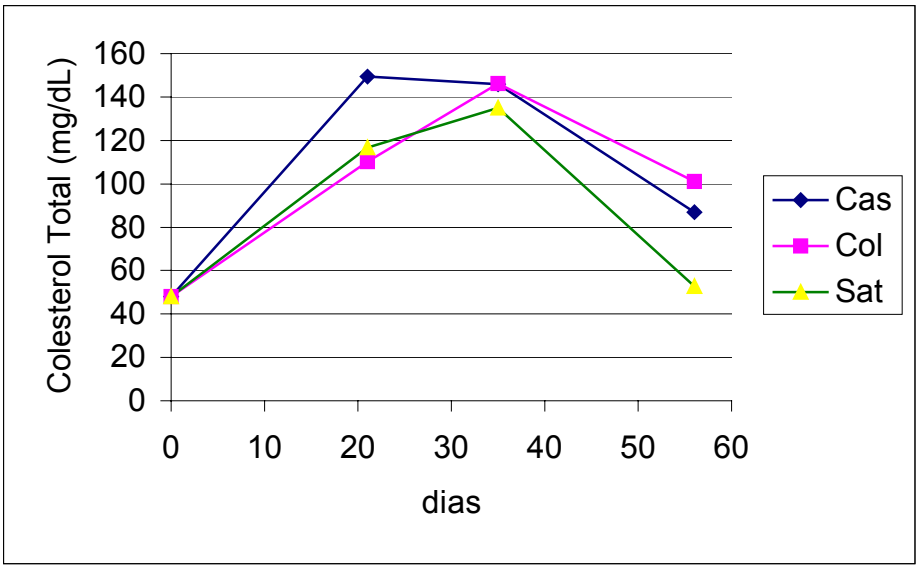


Figura 5.10. Concentração de colesterol total no plasma de hamsters do experimento Piloto.

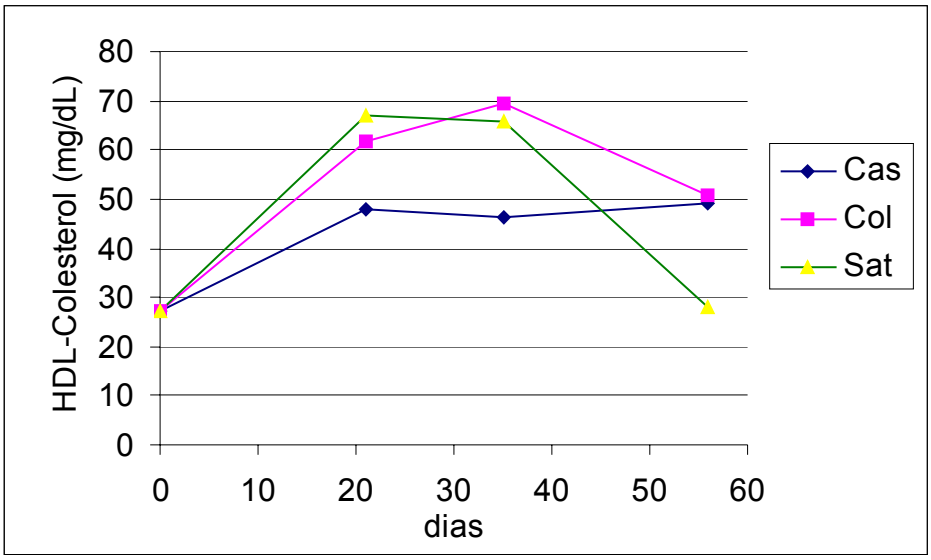


Figura 5.11. Concentração de HDL-Colesterol no plasma de hamsters do experimento Piloto.

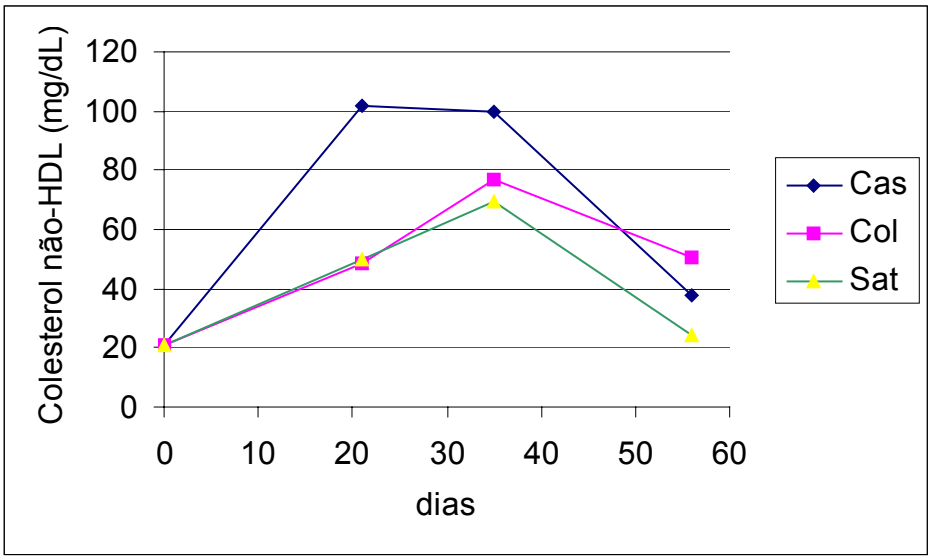


Figura 5.12. Concentração de Colesterol não-HDL no plasma de hamsters do experimento Piloto.

Embora todas as rações demonstrassem igual potencial para aumentar o colesterol, a dieta rica em caseína produziu um perfil bastante adequado para a indução de hipercolesterolemia no presente estudo (Figura 5.13), uma vez que teve como principal fração carreadora de colesterol a LDL (57%), já nas 3 primeiras semanas de dieta, simulando o que ocorre em humanos, quando estão em hipercolesterolemia.

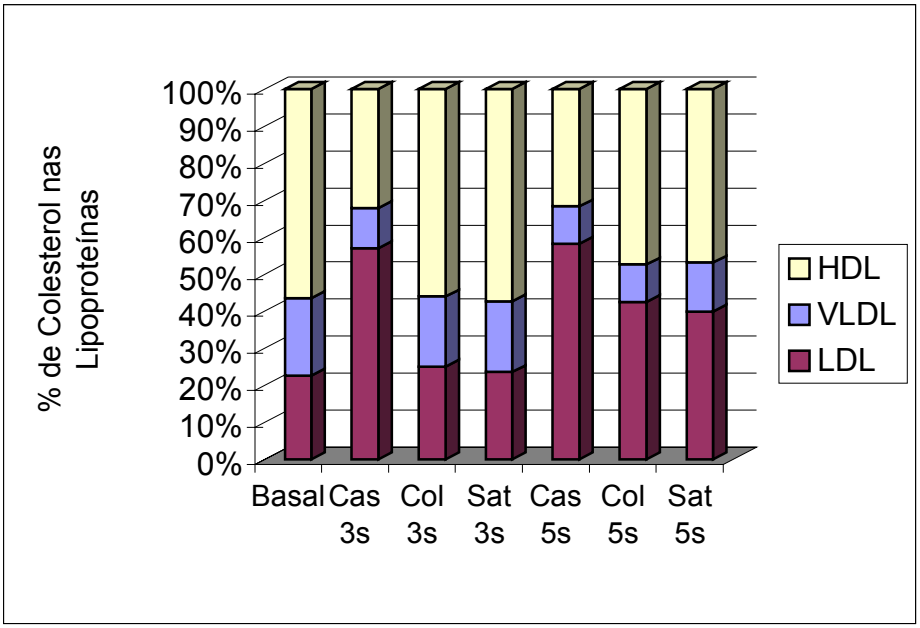


Figura 5.13. Distribuição do colesterol nas diferentes frações de lipoproteínas de acordo com a dieta e dia de coleta, em hamsters do ensaio Piloto (Cas: dieta caseína; Col: dieta colesterol; Sat: dieta saturados; 3s: coleta na 3ª semana; 5s: coleta na 5ª semana).

Sabe-se que uma dieta isenta de colesterol e enriquecida com caseína induz hipercolesterolemia em coelhos (BEYNEN *et al*. 1986; PFEUFFER 1989; DALEY *et al.* 1994). Os mecanismos pelos quais a hipercolesterolemia é induzida com a dieta de caseína podem ser classificados como gastrointestinais ou metabólicos. Entre os eventos gastrointestinais, estão as mudanças na excreção e absorção de esteróis e aumento na absorção de ácidos biliares. Os eventos metabólicos incluem modificações na secreção de VLDL, nos receptores de LDL e na atividade da HMG-CoA redutase (PFEUFFER 1989).

A absorção aumentada dos ácidos biliares induzida pela caseína leva a uma maior concentração de ácidos biliares na veia porta e, consequentemente, no fígado. Isso levaria à inibição da enzima 7α-hidroxilase, enzima que catalisa o primeiro passo na conversão de colesterol em ácidos biliares. Assim, a síntese reduzida de ácidos biliares resultaria em quantidades aumentadas de colesterol no fígado (BEYNEN *et al.* 1986).

Os eventos metabólicos provocados pela dieta de caseína estão relacionados à diminuição na ligação da β-VLDL aos receptores no fígado e consequente diminuição no catabolismo de VLDL (BEYNEN *et al.* 1986). Isso levaria ao aumento de VLDL no plasma e aumento da conversão de VLDL e IDL em LDL, provocando uma elevação desta última (PFEUFFER 1989) similar à observada em humanos.

5.9. Experimento Hipercolesterolemizante em Fêmeas

Neste ensaio as fêmeas de hamsters foram alimentadas com a dieta Hipercolesterolemizante, sendo que a partir da terceira semana, dois animais foram sacrificados a cada duas semanas (21, 35, 49 e 63 dias)

Conforme mostra a Tabela 5.23 não houve alteração do consumo ao longo do experimento. O peso do fígado ou a proporção do mesmo com relação ao peso do animal, também não foi alterado.

Tabela 5.23 - Consumo e peso do fígado para os animais mantidos por diferentes tempos na dieta hipercolesterolemizante no experimento Hipercolesterolemizante em Fêmeas.

	21 dias	**35 dias**	**49 dias**	**63 dias**
Consumo Diário Médio (g)	7,54 a (± 1,70)	6,63 b (± 1,90)	6,43 b (± 1,22)	7,29 ab (± 0,87)
Peso Fígado/Peso do Animal (%)	Nd	4,20 a (± 0,12)	4,31 a (± 0,64)	3,67 a (± 0,08)
Peso do Fígado (g)	Nd	4,86 a (± 0,024)	5,74 a (± 1,90)	5,14 a (± 1,06)

Valores são apresentados como média(n=3 animais/grupo) e entre parêntese esta representado o desvio padrão
As médias em mesma linha, seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si através de Teste de Tukey (Assistat 7.3 Beta) ($p<0.05$)
Nd = não determinado

Os níveis de colesterol total, triglicérides, HDL-C e de Colesterol não-HDL não variaram de forma significativa ao longo da terceira e nona semanas. Todos estes índices aumentaram do nível basal até três semanas, que foi o período

escolhido para indução de hipercolesterolemia nos hamsters dos estudos aplicados neste trabalho (Tabela 5.24). Os níveis destes componentes permanecendo altos podem ter causado injúrias teciduais, como a formação de placa de ateroma e esteatose. Isto será investigado futuramente através das lâminas dos órgãos coradas por hematoxilina-eosina já preparadas e, atualmente, armazenadas.

Tabela 5.24 – Perfil lipídico plasmático durante o experimento Hipercolesterolemizante em Fêmeas.

	Basal	**21 dias**	**35 dias**	**49 dias**	**63 dias**
Triglicérides (mg/dL)	105,0 b (± 45,1)	142,0 a (± 49,5)	138,0 a (± 9,2)	162,0 a (± 115,7)	152,0 a (± 94,1)
Colesterol Total (mg/dL)	91,0 b (± 13,1)	145,0 a (± 25,5)	142,0 a (± 12,7)	133,0 a (± 29,7)	140,0 a (± 11,3)
HDL-C (mg/dL)	60,0 b (± 6,2)	92,0 a (± 15,6)	95,0 a (± 9,9)	88,0 a (± 18,4)	105,0 a (± 7,8)
Colesterol não-HDL (mg/dL)	32,0 b (± 8,3)	53,0 a (± 9,9)	47,0 a (± 2,3)	45,0 a (± 11,3)	36,0 ab (± 3,5)

Valores são apresentados como média (basal n=5 e os outros n=2 animais/grupo) e entre parêntese esta representado o desvio padrão
As médias em mesma linha, seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si através de Teste de Tukey (Assistat 7.3 Beta) ($p<0.05$)

BEYNEN *et al.* (1983) afirmam que quando se altera a dieta de coelhos de proteína de soja para caseína, a hipercolesterolemia já é observada dentro de 7 dias (aumento de 55%) e é progressiva até o fim do experimento. Após 36 dias o aumento atinge cerca de 120% do valor inicial. Apesar do aumento do colesterol, a concentração plasmática HDL-C não aumentou de forma significativa. O colesterol total aumentou devido ao aumento das frações LDL e IDL. A síntese da apolipoproteína B, presente na LDL, é estimulada pela dieta contendo caseína (KHOSLA *et al*., 1989).

A distribuição do colesterol nas lipoproteínas, neste experimento, está representada na Figura 5.14.

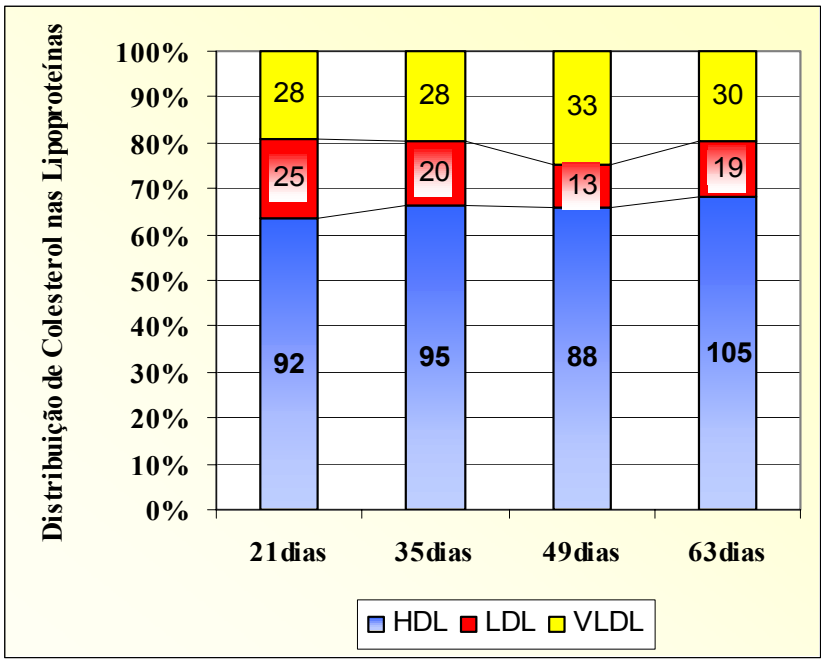


Figura 5.14. Distribuição do colesterol nas diferentes lipoproteínas nos animais sacrificados no decorrer do experimento Hipercolesterolemizante em Fêmeas (os números assinalados nas barras referem-se aos valores colesterol expressos em mg/dL da respectiva fração lipoprotéica).

O hamster, assim como o homem, tem CETP no plasma (STEIN *et al*. 1990), o que o faz melhor modelo animal dentre outros animais que não a possuem, como suínos, ratos e camundongos. A função da CETP é trocar triglicérides por ésteres de colesterol na HDL. O plasma de hamsters, no entanto, apresenta baixo nível da proteína CETP, e diferente dos humanos hipertrigliceridêmicos, altas

concentrações de triglicérides não resultam em uma perda de colesterol éster pela HDL (ROBINS *et al*. 1995). Isto poderia explicar porque a concentração de triglicérides e HDL-C aumentaram concomitantemente.

5.10. É Possível Comparar os Resultados dos Machos e das Fêmeas?

O experimento Principal foi realizado com machos e o experimento Aminoácidos foi realizado com fêmeas, ambos os grupos eram hamsters recém-desmamados da mesma linhagem, com aproximadamente 3 semanas de vida. Análises estatísticas baseadas no peso e perfil lipídico foram feitas para averiguarem se machos e fêmeas poderiam ser comparados, pois tinham comportamento semelhante na parte inicial do estudo, que é a indução de hipercolesterolemia e receberam a mesma dieta Controle.

No momento da chegada, os machos apresentam peso semelhante aos das fêmeas (57,5 g e 57,0 g). No entanto, após o consumo da dieta hipercolesterolemizante as fêmeas, por em media terem maior consumo que os machos, apresentaram peso maior, 104,5 g (± 12,9) ao passo que os machos pesavam 87,6 g (± 10,9).

O colesterol total, variável mais importante do estudo, estava significativamente maior nas fêmeas (91,4 mg/dL) que nos machos (72,8 mg/dL) no

momento basal. Após a dieta hipercolesterolemizante, observou-se que as medidas plasmáticas dos dois sexos foram semelhantes, e tornaram-se novamente diferentes quando comparamos os animais que consumiram dieta Controle.

Os teores de colesterol na HDL foram os prováveis responsáveis por esta diferença do período basal e da dieta controle (Tabela 5.25). Se considera-se o valor de Colesterol não-HDL, o que em suma, é aquele geralmente afetado por manipulações dietéticas, as comparações entre machos e fêmeas parecem possíveis.

Tabela 5.25 – Comparação de médias das variáveis plasmáticos de machos e fêmeas antes do início das dietas experimentais (basal), após 3 semanas de consumo da dieta hipercolesterolemizante e 4 semanas de consumo da dieta controle, e seus respectivos p-valores da análise de variância (ANOVA).

Variável	Momento	Macho	Fêmea	p-valor
Colesterol	Basal	72,8 ± 10,7	91,4 ± 13,1	**0,013**
Total	Hiper	133,0 ± 18,9	141,7 ± 20,5	0,368
(mg/dL)	Controle	126,4 ± 14,1	146,2 ± 20,8	**0,030**
Triglicérides	Basal	112,0 ± 24,6	104,8 ± 45,1	0,722
(mg/dL)	Hiper	126,0 ± 30,3	137,1 ± 53,4	0,566
	Controle	125,5 ± 33,3	78,4 ± 45,1	**0,025**
HDL-C	Basal	45,3 ± 6,7	59,8 ± 6,2	**0,003**
(mg/dL)	Hiper	78,6 ± 8,3	86,5 ± 11,6	**0,091**
	Controle	89,6 ± 9,2	112,8 ± 18,9	**0,005**
Não-HDL-C	Basal	25,4 ± 4,5	31,6 ± 8,3	0,124
(mg/dL)	Hiper	54,4 ± 11,9	51,9 ± 11,4	0,640
	Controle	36,8 ± 7,0	33,3 ± 14,6	0,529

ROBINS *et al*. (1995) comparando diferenças entre machos e fêmeas de hamster da linhagem F1B, encontraram que quando submetidos a uma dieta de alto teor de gordura, rica em ácidos graxos saturados, as fêmeas responderam com maior aumento de HDL-C ao passo que os machos tiveram maior aumento do Colesterol não-HDL. No entanto, diferentemente dos resultados observados no presente experimento, as fêmeas tiveram aumento do teor de colesterol total menor que o dos machos; este fator de proteção foi revertido quando as mesmas foram ovarectomizadas.

5.11. Experimento Biológico Principal

5.11.1 Consumo de Dieta e Peso dos Animais

O consumo de dieta, ingestão total durante as quatro semanas do experimento, consumo diário médio e coeficiente de eficácia alimentar das dietas controle, dieta contendo caseína e isolado protéico de amaranto (CAS+AM) e dieta com proteína isolada de amaranto estão apresentados na Tabela 5.26.

O consumo de dieta foi aferido diariamente, pela diferença entre o alimento oferecido e o residual. O coeficiente de eficácia alimentar foi obtido pelo

quociente entre o ganho de peso total e o consumo de dieta durante os 28 dias (dieta experimental) e 21 dias para dieta hipercolesterolemizante (Hiper).

Tabela 5.26 - Ingestão de dieta diária, ganho de peso e coeficiente de eficácia alimentar para hamsters alimentados com diferentes dietas no experimento Principal.

	Hiper	**Controle**	**CAS+AM**	**AM**
Peso Ganho (g)	27,08 a (±13,06)	26,75 a (±9,67)	15,82 ab (±16,66)	5,91 b (±13,06)
Ingestão Total de Dieta (g)	111,95 a (±14,32)	150,90 b (±14,11)	152,93 b (±28,93)	134,12 b (±39,06)
Consumo Diário Médio (g)	5,27 a (±1,02)	6,69 c (±1,14)	6,12 b (±1,8)	5,37 a (±1,73)
CEA(%)	22,31 a (±10,62)	17,70 ab (±6,24)	9,10 bc (±10,03)	3,44 c (±9,93)

CEA: Coeficiente de eficácia alimentar= peso ganho/ingestão de alimentos x100
As médias em mesma linha, seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si através de Teste de Tukey (Assistat 7.3 Beta) ($p<0.05$)

Os animais alimentados com dieta controle tiveram maior consumo diário médio, mas na soma da ingestão total no período não diferiu do grupo CAS+AM, nem do grupo AM. Os animais alimentados com a dieta AM, embora tivessem o consumo médio semelhante ao da dieta Hiper, apresentaram ganho de peso inferior ao desta e ao da dieta controle, o que refletiu no menor coeficiente de eficácia alimentar.

Hamsters que consumiram a dieta CAS+AM, embora tivessem ingestão total de dieta e ganho de peso similares ao da dieta Controle, apresentaram um CEA menor que esta, embora não diferindo significativamente, e comparável à dieta AM. Ou seja, ambas as dietas contendo proteína de amaranto tiveram tendência a apresentar CEA inferiores aos das dietas contendo exclusivamente caseína, mesmo

quando o consumo foi igual ao de outras rações. Mesmo alimentando-se apenas três semanas, o grupo Hiper teve ganho de peso similar ao da dieta Controle e CAS+AM.

5.11.2. Peso do Fígado

O peso do fígado, bem como a relação peso do fígado/peso do animal, dos animais alimentados com as dietas CAS+AM ou AM não diferiram entre si e foram inferiores aos dos animais alimentados com a dieta controle (Tabela 5.27).

Tabela 5.27 - Peso do fígado dos hamsters do experimento Principal

	Controle	**CAS+AM**	**Amaranto**
Peso do Fígado (g)	5,13 a (±0,42)	3,47 b (±0,74)	2,86 b (±0,46)
Peso Fígado/ Peso do Animal (%)	4,24 a (±0,31)	3,37 b (±0,39)	3,08 b (±0,30)

As médias em mesma linha, seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si através de Teste de Tukey (Assistat 7.3 Beta) ($p<0.05$)

TRAUTWEIN *et al*. (1993b) consideraram a relação peso do fígado/peso do animal 3,7% mais desejável do que valores maiores, pois maiores valores estavam associados ao acúmulo de colesterol no fígado. Em outro trabalho, comparando 4 linhagens de hamsters alimentados com dieta isenta de colesterol, a porcentagem de

peso do fígado em relação ao peso corporal variou em torno de 3,5 a 4,1% (TRAUTWEIN *et al*.1993a).

Ratos alimentados com dieta contendo 1% de colesterol tiveram o peso do fígado em torno de 4,1% do peso corpóreo, ao passo que os que tiveram amaranto adicionado à dieta, tiveram o peso do fígado menor (3,7%). Estes últimos apresentavam menores teores de lipídeos totais (38%) e de colesterol (44%) no fígado (CHATUVERDI *et al*. 1993).

Considerando estes autores, os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com a literatura.

5.11.3. Perfil Lipídico

A concentração plasmática de colesterol total, triglicérides e colesterol contido nas lipoproteínas HDL, VLDL e LDL, está ilustrada nas Figuras 5.15 a 5.19, para os animais que sofreram coleta antes do início de experimento (basal), após três semanas alimentando-se com dieta hipercolesterolemizante (rica em caseína); cinco dias após o início do consumo das dietas experimentais controle, CAS+AM, AM e ao final do período experimental.

Com objetivo de verificar se houve variações dos níveis plasmáticos das lipoproteínas foi necessária a utilização de três análises de variância (NETER *et al*. 1996), devido à forma como os dados foram coletados. Análises estatísticas foram

realizadas considerando quatro variáveis plasmáticas: colesterol total, triglicérides, HDL-C e colesterol não-HDL (soma de colesterol contido na LDL e VLDL). Para os casos de rejeição de hipótese de igualdade das médias (Anexo 2), foram realizadas comparações múltiplas de Bonferroni (NETER *et al*., 1996).

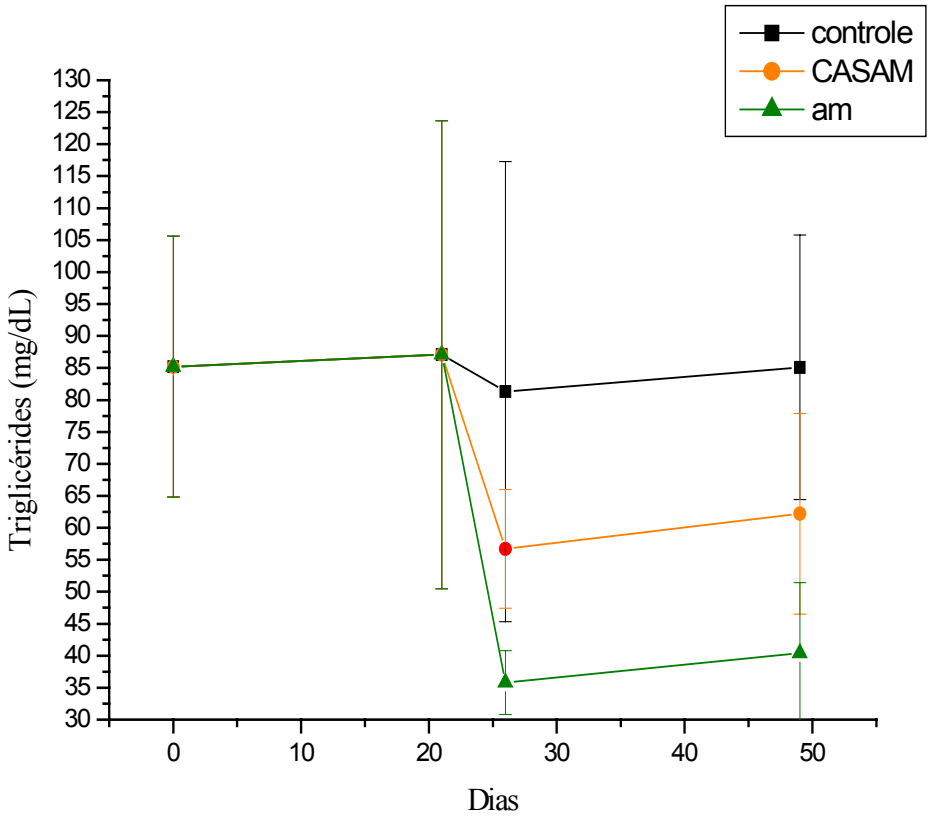


Figura 5.15. Concentração de triglicérides no plasma de hamsters nos diferentes momentos (0 Dias: após adaptação dos animais ao biotério; 21 Dias: após 3 semanas de dieta hipercolesterolemizante; 26 dias: após 5 dias das dietas experimentais; 49 Dias: após 28 dias das dietas experimentais) do experimento Principal.

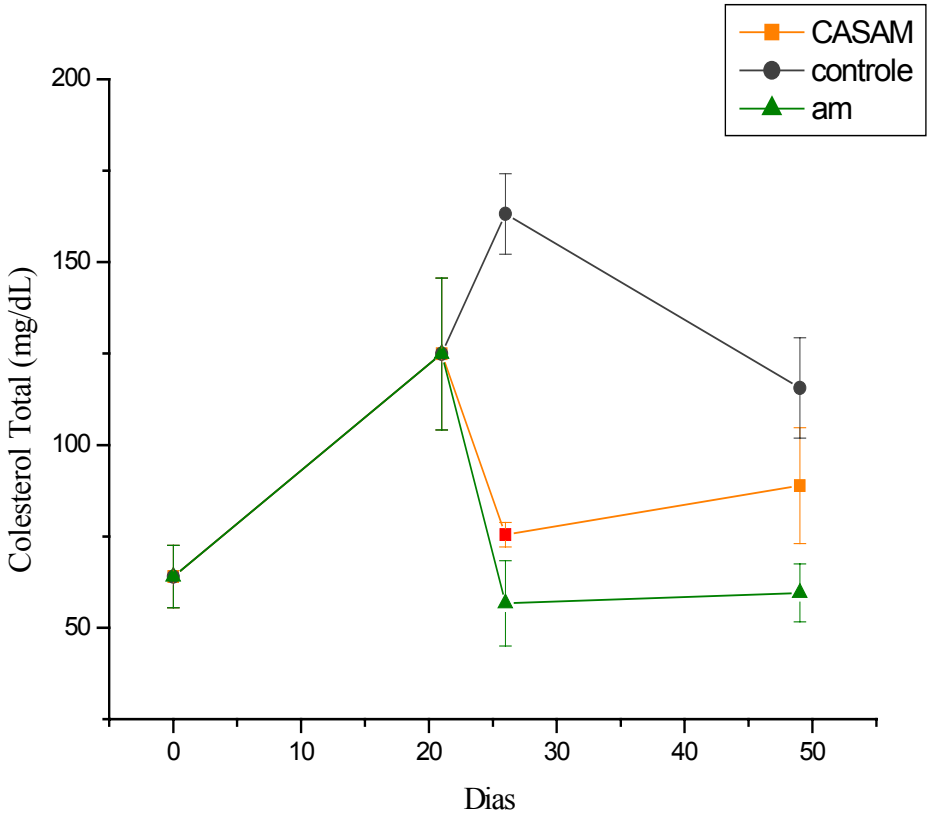


Figura 5.16. Concentração de colesterol total no plasma de hamsters nos diferentes momentos (0 Dias: após adaptação dos animais ao biotério; 21 Dias: após 3 semanas de dieta hipercolesterolemizante; 26 dias: após 5 dias das dietas experimentais; 49 Dias: após 28 dias das dietas experimentais) do experimento Principal.

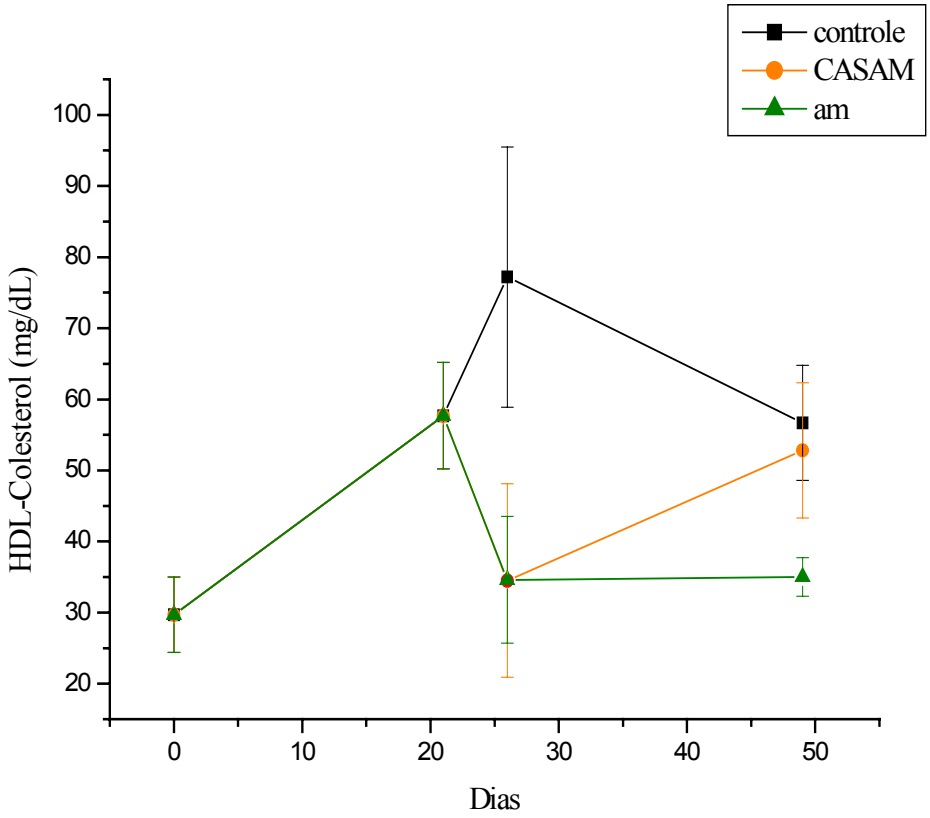


Figura 5.17. Concentração de HDL-Colesterol no plasma de hamsters nos diferentes momentos (0 Dias: após adaptação dos animais ao biotério; 21 Dias: após 3 semanas de dieta hipercolesterolemizante; 26 dias: após 5 dias das dietas experimentais; 49 Dias: após 28 dias das dietas experimentais) do experimento Principal

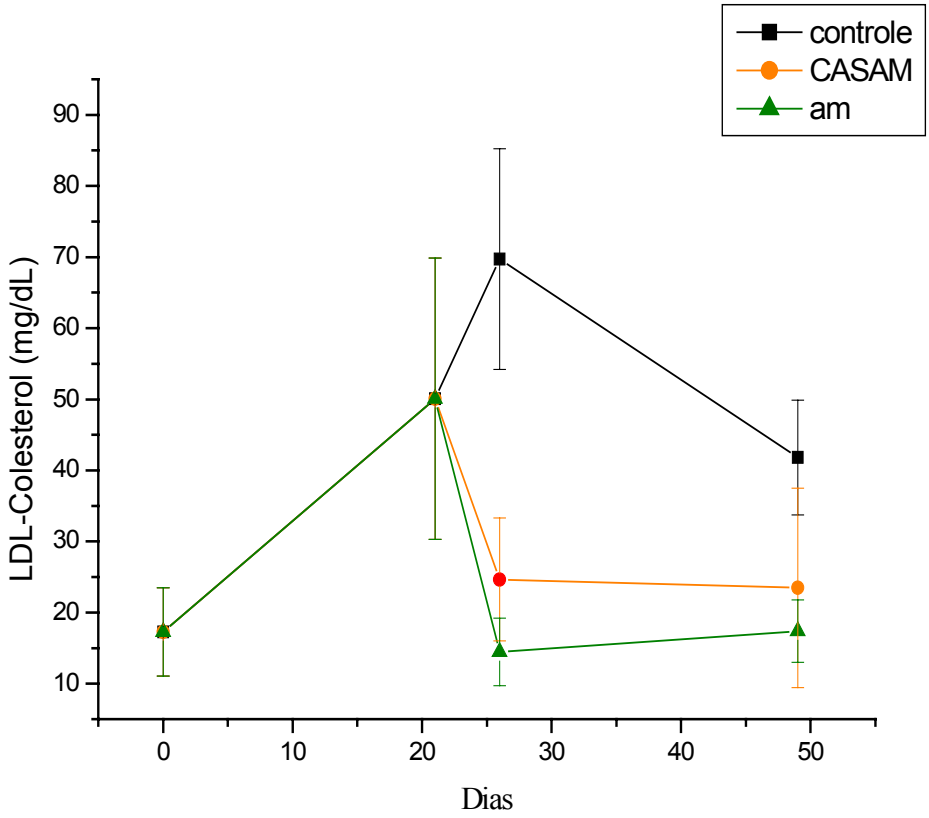


Figura 5.18. Concentração de LDL-Colesterol no plasma de hamsters nos diferentes momentos (0 Dias: após adaptação dos animais ao biotério; 21 Dias: após 3 semanas de dieta hipercolesterolemizante; 26 dias: após 5 dias das dietas experimentais; 49 Dias: após 28 dias das dietas experimentais) do experimento Principal

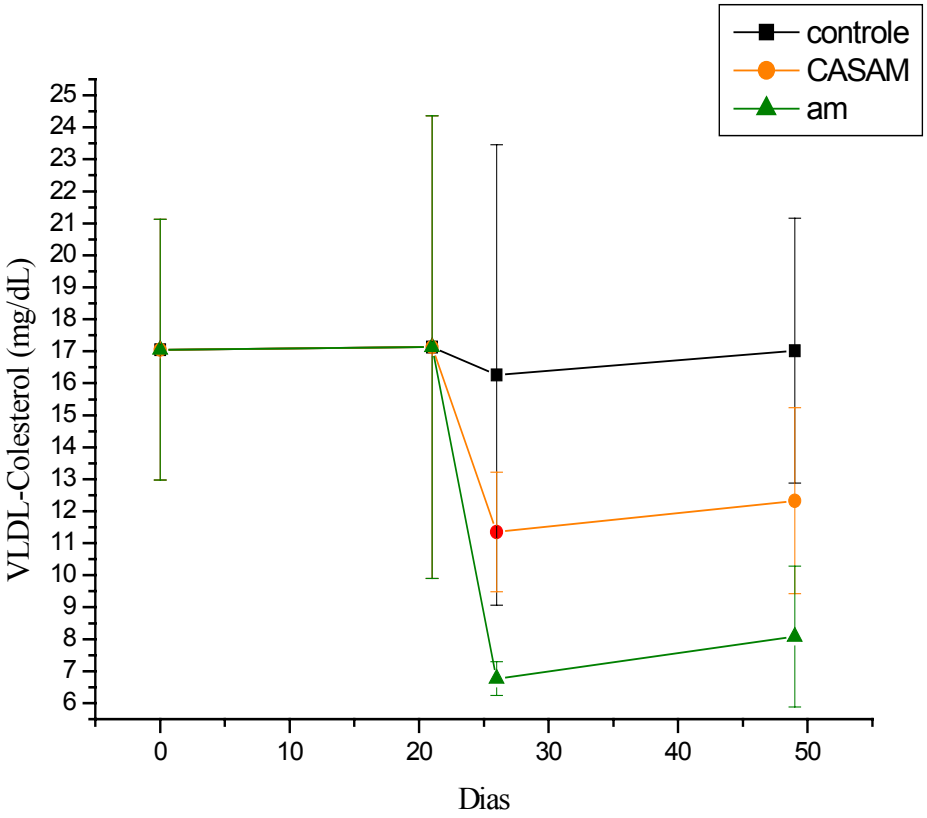


Figura 5.19. Concentração de VLDL-Colesterol no plasma de hamsters nos diferentes momentos (0 Dias: após adaptação dos animais ao biotério; 21 Dias: após 3 semanas de dieta hipercolesterolemizante; 26 dias: após 5 dias das dietas experimentais; 49 Dias: após 28 dias das dietas experimentais) do experimento Principal.

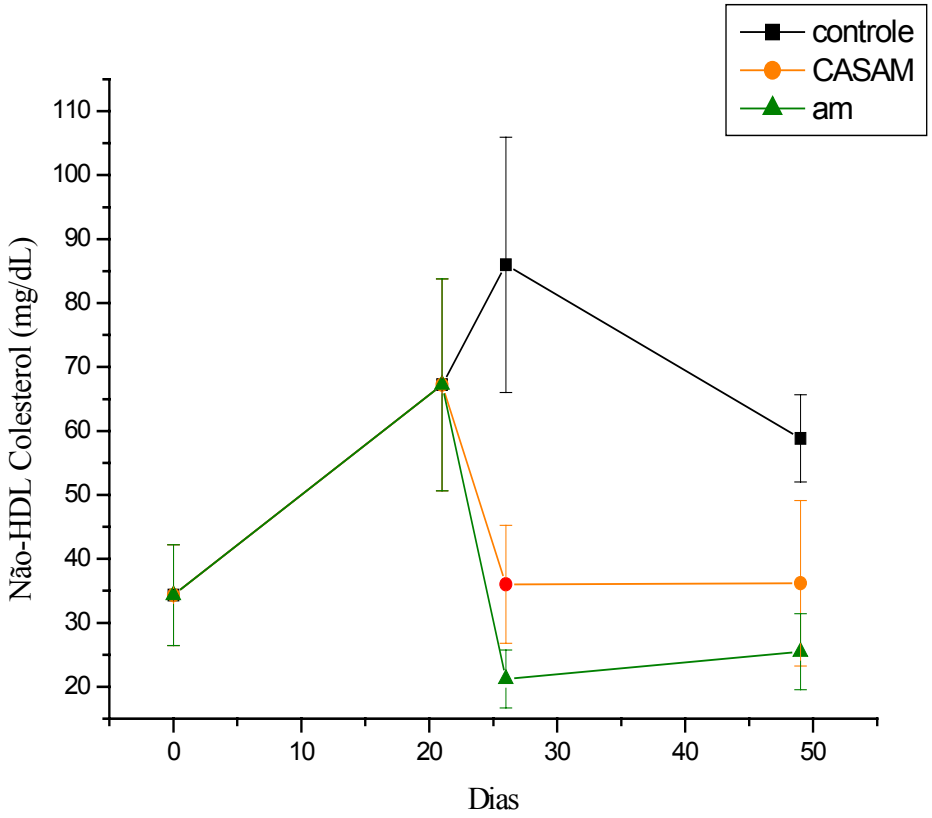


Figura 5.20. Representação conjunta da concentração de VLDL-Colesterol e LDL-Colesterol, como Colesterol não-HDL no plasma de hamsters nos diferentes momentos (0 Dias: após adaptação dos animais ao biotério; 21 Dias: após 3 semanas de dieta hipercolesterolemizante; 26 dias: após 5 dias das dietas experimentais; 49 Dias: após 28 dias das dietas experimentais) do experimento Principal.

No primeiro conjunto de análises de variância (ANOVA), foram ajustados modelos com o objetivo de verificar se há diferença entre os valores médios coletados na etapa basal, após o consumo da dieta hiper e após uma semana de consumo das dietas experimentais (Anexo 3).

No segundo conjunto de análises de variância, foram ajustados modelos similares aos do primeiro conjunto, porém, ao invés dos valores plasmáticos coletados após a primeira semana de consumo das dietas experimentais, utilizaram-se os do final das quatro semanas de consumo destas dietas (Anexo 4).

Finalmente, o terceiro conjunto de análises de variância, teve como objetivo comparar os valores plasmáticos após o consumo de uma e quatro semanas das dietas experimentais (Anexo 5). Estes modelos de ANOVA incluem as dietas experimentais e medidas repetidas no tempo, e utilizam diferenças de médias para testar a hipótese de igualdade das mesmas.

As Figuras 5.21 a 5.23 representam graficamente os resultados estatísticos encontrados nos Anexos 2 a 5.

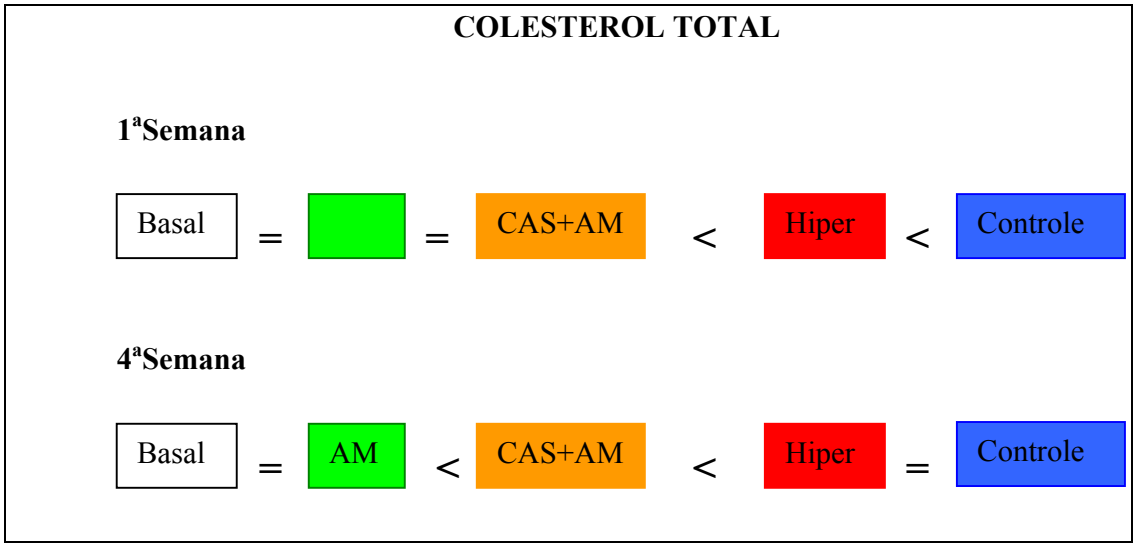


Figura 5.21. Representação dos resultados estatísticos para análise de colesterol total nas diferentes dietas na primeira e quarta semana do experimento Principal

A indução de hipercolesterolemia foi eficiente, pois o grupo de animais alimentados com a dieta hipercolesterolemizante apresentou valores de colesterol total, colesterol HDL e não-HDL superiores aos apresentados pelos animais do período basal. Apenas o teor de triglicérides entre os dois momentos do experimento não apresentou diferença estatística.

Os teores de colesterol total dos grupos AM e CAS+AM foram iguais aos do período Basal e diferentes do Hiper e do grupo Controle já na primeira semana de dieta experimental, estes não diferindo entre si. Já o grupo Controle continuou a ter aumento do colesterol por mais alguns dias e apresentou, após seu início, concentração significativamente maior que o grupo Hiper. Após 4 semanas de dieta o grupo CAS+AM teve um pequeno aumento no colesterol total, o que o levou a ficar diferente estatisticamente do teor basal, mas ainda inferior estatisticamente aos grupos hiper e controle. O grupo AM permaneceu com níveis semelhantes ao basal, e inferior estatisticamente a todos os outros grupos. A Figura 5.21 resume estas observações.

Os resultados encontrados para o efeito hipocolesterolêmizante da proteína de amaranto são consistentes com os encontrados para a proteína de soja em hamsters (FERNANDEZ et al. 1999; FORSYTHE *et al*. 1991; LIN *et al*. 2004; TERPSTRA *et al*. 1991). FORSYTHE *et al*. (1991) relatam que a concentração plasmática de colesterol nos animais alimentados com dieta contendo soja só foi significativamente menor a partir do quinto dia da introdução da dieta e manteve-se baixa até o final do experimento.

Por outro lado, WRIGHT e SALTER (1998) não obtiveram uma diferença significativa no teor plasmático de colesterol total em hamsters alimentados com caseína ou proteína de soja, embora tenham encontrado diferença no teor de VLDL e excreção de esteróis nas fezes entre os dois grupos.

Em relação à concentração plasmática de triglicérides, os animais do grupo Amaranto na primeira semana foram os únicos a diferirem significativamente de quando os animais estavam hipercolesterolemizados. Ao final do experimento, seus teores eram ainda menores do que os apresentados no período basal. O grupo CAS+AM voltou a ter valores diferentes do período de hipercolesterolemia apenas ao final das quatro semanas e o grupo Controle, apesar de igualar-se ao valor do período basal não diferiu do período de hipercolesterolemia.

QURESHI *et al.* (1996) também verificaram redução de triglicérides em animais alimentados com amaranto ou óleo de amaranto.

Após uma semana de dieta experimental, a concentração plasmática de colesterol na HDL dos grupos AM e CAS+AM foram iguais ao do período basal e diferente do período hipercolesterolemizado. O grupo Controle apresentou teor maior que o grupo Hiper. Os teores de colesterol da HDL em todos os grupos, após 4 semanas, com exceção do grupo AM, foram maiores, quando comparados ao nível basal. CAS+AM, hiper e controle não diferiram entre si, e diferiram do grupo AM.

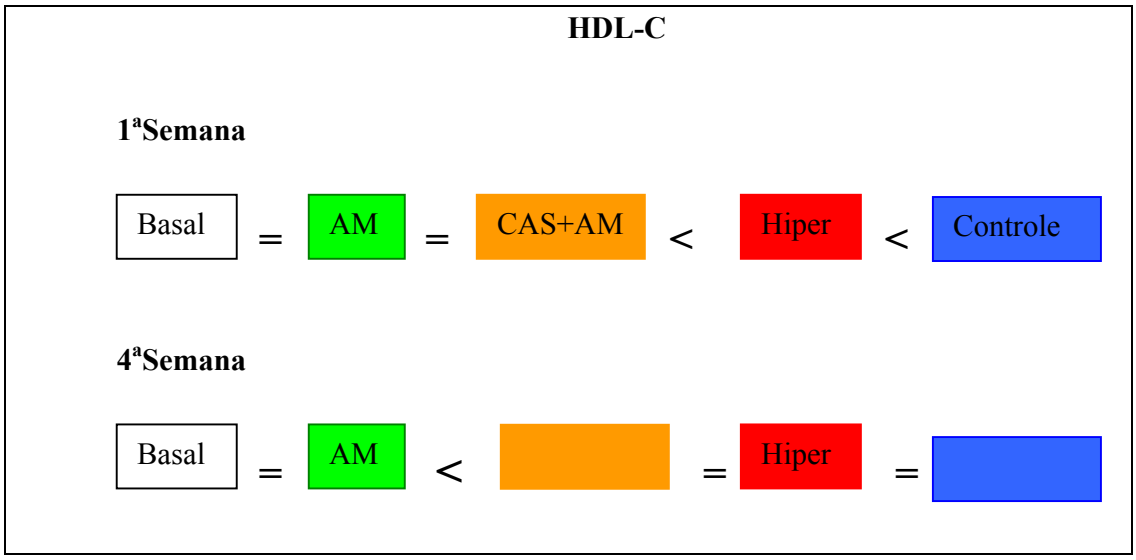


Figura 5.22. Representação dos resultados estatísticos para análise de HDL-Colesterol nas diferentes dietas na primeira e quarta semana do experimento Principal.

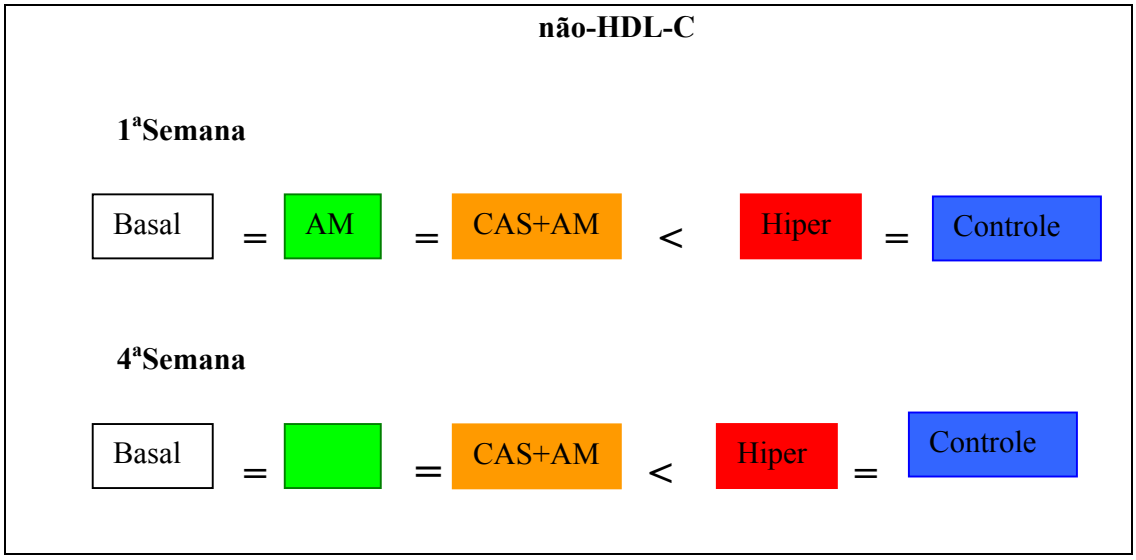


Figura 5.23. Representação dos resultados estatísticos para análise de Colesterol não-HDL nas diferentes dietas na primeira e quarta semana do experimento Principal.

Para a variável Colesterol não-HDL, observou-se o mesmo padrão de comportamento na primeira e quarta semana para todas as dietas experimentais. Os animais alimentados com dieta Controle e Hiper tiveram maior concentração que no período basal, mas não diferiram entre si; enquanto os grupos CAS+AM e AM foram iguais aos níveis basais, e entre si. Estas duas últimas dietas diferiram em relação aos níveis apresentados no período hipercolesterolemizante e em relação ao grupo Controle.

Comparando as oscilações das variáveis plasmáticas dentro do seu próprio grupo ao longo do tempo, os animais do grupo controle e CAS+AM não diferiram quanto ao teor de colesterol não-HDL avaliado na primeira e quarta semanas. Os animais do grupo Am tiveram teor de colesterol não-HDL menor na primeira semana se comparado à sua quarta semana.

Há várias evidências de estudos em animais e em humanos que a substituição da caseína na dieta por proteína de soja reduz a concentração de colesterol total e de colesterol de LDL no plasma ou soro (CARROLL e KUROWSKA 1995; TERPSTRA *et al*. 1991).

Em duas meta-análises CARROLL (1991) e ANDERSON (1995) que abordavam os efeitos da proteína de soja em humanos, foi observado que o efeito hipocolesterolemizante só era significativo quando havia hipercolesterolemia moderada ou severa, e que o HDL-C não sofria alteração.

O hamster tem sido bastante usado para estudar os efeitos do colesterol e lipídeos da dieta no metabolismo de lipoproteínas (SPADY e DIETSCHY, 1988) Alguns trabalhos utilizaram este modelo animal para o estudo do efeito de proteínas

no metabolismo lipídico (FERNANDEZ *et al.* 1999; TERPSTRA *et al.* 1991; WRIGHT e SALTER 1998).

Humanos transportam a maior parte do seu colesterol plasmático nas lipoproteínas VLDL e LDL e estas frações estão geralmente elevadas em sujeitos hipercolesterolêmicos, e sua concentração elevada é um importante fator para o desenvolvimento da aterosclerose. Por outro lado, na maioria dos modelos animais o colesterol é carreado pela HDL. Uma linhagem especial de hamsters, criada nos Estados Unidos, chamada Bio F_1B, por sua vez, ao ser alimentada com dieta hipercolesterolemizante, apresenta perfil de lipoproteínas comparável ao dos humanos (KOWALA *et al.* 1993; TRAUTWEIN *et al.* 1993a,b). Outros autores afirmam de forma genérica que hamsters alimentados com dieta com alto teor de colesterol desenvolvem um perfil de lipoproteínas caracterizado por uma elevada relação VLDL/HDL_2 (HAYES *et al*. 1992).

CHEUNG (1998) determinando níveis basais de colesterol e suas frações em hamsters pelos mesmos métodos empregados no presente trabalho, encontrou que 75% do colesterol era transportado em partículas HDL no nível basal, e que o colesterol total estava em torno de 130 mg/dL. Quando a hipercolesterolemia foi induzida pela presença de 0,2% de colesterol na dieta, a distribuição mudou para 50% do colesterol sendo transportado por HDL.

TRAUTWEIN *et al.* (1993b) avaliaram o perfil de lipoproteínas de hamsters no estado basal e verificaram que o colesterol estava distribuído 63% em partículas HDL e 37% em partículas não-HDL (VLDL+LDL). Após quatro semanas

de dieta hipercolesterolemizante contendo 0,4% de colesterol, a porcentagem de colesterol presente nas partículas não-HDL foi de 52%.

WRIGHT e SALTER (1998) estudando a diferença de dieta de caseína e proteína de soja na hipercolesterolemia induzida por alto teor de ácidos graxos saturados (e apenas 0,01% de colesterol) fracionaram as lipoproteínas por ultracentrifugação, e encontraram que, independentemente da coleta ser realizada em estado de jejum ou pós-prandial, a HDL é a principal carreadora de colesterol (61 e 64%). TRATWEIN *et al*. (1993a) estudando quatro linhagens de hamsters alimentadas com dieta isenta de colesterol encontraram que em todas elas a HDL é o principal carreador de colesterol, variando de 59 a 70% a quantidade de colesterol carreada por esta fração.

FORSYTHE *et al.* (1986) relatam que quando gerbils foram alimentados com dieta contendo 0,1% de colesterol, contendo caseína ou proteína de soja, o teor de HDL-Colesterol não foi diferente entre os dois grupos. No entanto, a porcentagem de colesterol transportado em HDL foi de 59% para animais alimentados com caseína e de 73% para animais alimentados com proteína de soja. Os autores concluíram, com isso, que o gerbil responde as alterações da fonte protéica como outras espécies animais.

TERPSTRA *et al*. (1991) comparando a proteína de soja com a caseína apontaram que 72% e 67% do colesterol são transportados pela HDL, respectivamente, quando a dieta é isenta de colesterol. Ao passo que estas proporções mudam para 53 e 38% quando da presença de 0,1% de colesterol na dieta.

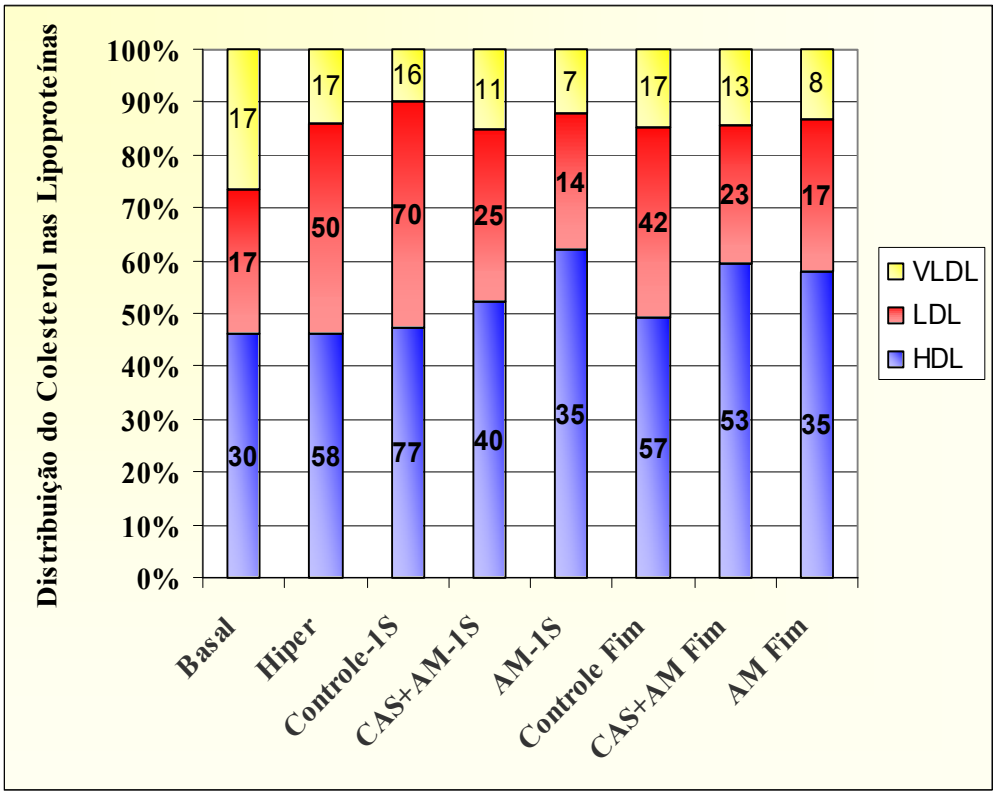


Figura 5.24. Distribuição do colesterol nas diferentes lipoproteínas dos animais do experimento Principal, de acordo com a dieta e momento da coleta (os números assinalados nas barras referem-se aos valores colesterol expressos em mg/dL da respectiva fração lipoprotéica).

No presente experimento, 46% do colesterol no período basal estava presente na partícula HDL enquanto que o restante estava igualmente distribuído entre LDL e VLDL (27% para cada). Quando houve indução de hipercolesterolemia por excesso de caseína (presença de 0,05% de colesterol), o colesterol total aumentou em 93% em relação ao período basal, e os animais apresentaram mesma porcentagem de colesterol sendo carreado por HDL, no entanto a quantidade de colesterol

carreado por LDL aumentou para 40%. A VLDL não acompanhou o aumento do colesterol total, sendo responsável agora pelo transporte de 14% do colesterol total.

Quando os níveis de colesterol total estão baixos, grande parte do colesterol sérico é transportado pela HDL. No entanto, com a indução da hipercolesterolemia, há proporcionalmente uma redução do colesterol carreado por esta partícula, apesar do aumento do colesterol total. Além disso, prova que o hamster é mesmo um modelo útil no estudo do metabolismo lipídico, por reagir da mesma forma que humanos a dieta hipercolesterolemizante.

A porcentagem de colesterol HDL, e não seu valor absoluto, foi considerado, uma vez que ele se relaciona melhor com valores totais de colesterol plasmático. Pode-se dizer que quando a dieta foi redutora de colesterol total, a porcentagem de colesterol carreado por HDL foi superior a 50%. Atendo-se a valores absolutos, poderíamos concluir que o teor de HDL-Colesterol dos animais alimentados com dieta amaranto foi inferior ao dos animais alimentados com dieta hipercolesterolemizante, quando na verdade, o colesterol estava sendo carreado em mais de 55% pela HDL na dieta AM, e em 46% na dieta hiper. GATCHALIAN-YEE *et al.* (1997) embora também tenham notado uma diminuição do HDL-colesterol quando a concentração de colesterol total foi diminuída, relata que não houve diferença significativa na relação HDL-C/colesterol total, no entanto neste estudo todas as dietas continham proteína de soja, inclusive o controle.

Uma outra forma de expressar estas relações é utilizando-se da proporção CT/ HDL-C. Obviamente, se nos hamsters repetir-se o transporte reverso de colesterol que ocorre em humanos, quanto menor esta proporção, melhor. No

presente experimento, esta proporção seria de 2,2 para dieta basal e hiper, 2,1 para dieta controle e 1,7 para dietas CAS+AM e AM.

BERGER *et al*. (2003a, 2003b) notaram esta mesma tendência.O efeito da substituição da dieta Controle em 20% de grão de amaranto provocou marcante redução do colesterol VLDL e nenhuma alteração no colesterol de LDL. Este fato foi explicado pela presença de excesso de ácidos graxos saturados na dieta, o que teria suprimido toda atividade dos receptores de LDL, fazendo com que sua secreção tornasse independente da VLDL. Em um estudo seguinte, onde esta influência foi corrigida, e embora a redução de colesterol total plasmático obtida tenha sido de apenas 10%, foi possível verificar que a redução deveu-se principalmente ao nível de LDL, pois a VLDL foi ligeiramente superior na dieta contendo amaranto (BERGER *et al*. 2003b).

QURESHI *et al.* (1996) estudando o efeito do amaranto em galinhas, concluíram que o *A. cruentus* foi capaz de reduzir em 33% o colesterol total, quando comparado a uma dieta controle contendo uma mistura de milho e soja. Além disso, concluíram que o HDL-C foi minimamente afetado, enquanto que a concentração de LDL-C foi notavelmente reduzida por todas as formas de amaranto e óleo de amaranto estudadas. Em especial, a forma pipoca apresentou redução de 70% do LDL-C, os autores atribuíram este efeito à concentração do esqualeno por perda de umidade durante o processamento, embora não tenham aferido o teor deste componente.

Em meta-análise de 38 testes clínicos, ANDERSON *et al*. (1995) investigaram os efeitos da proteína de soja nas concentrações séricas de lipídeos em

homens e mulheres. Foi estimado que o consumo médio de 47g/dia de proteína de soja em substituição à proteína animal, reduziu o colesterol total (9%), colesterol LDL (13%) e triglicérides (11%), enquanto que o HDL-colesterol não sofreu alterações em suas concentrações.

No caso da soja há ainda uma grande discussão se este efeito deve-se a proteína ou a fitoestrógenos (isoflavonas). Diversos estudos sugerem que as concentrações séricas de lipoproteínas só são afetadas pela isoflavona quando a proteína de soja está presente, representando um sinergismo entre os dois componentes ou uma ação predominante da proteína no metabolismo lipídico.

LUCAS (2001) avaliou a proteína de soja extraída com etanol (retirada de isoflavonas) e constatou que em fêmeas de hamster ovarectomizadas nenhum efeito pode ser atribuído à fonte protéica Por outro lado LIN *et al*. (2004) encontraram que a proteína de soja tem efeito hipocolesterolemizante, que pode ser potencializado na presença de fitoesteróis.

No presente estudo, como o isolado protéico de amaranto foi extraído com álcool e seu teor de esqualeno (um possível componente da fração lipídica) comprovadamente estava presente em quantidades diminutas, à proteína pode-se designar como o fator hipocolesterolemizante.

5.11.4. Correlação entre as Variáveis Plasmáticas e Consumo

As variáveis peso do animal, consumo de dieta, bem como as variáveis plasmáticas foram comparadas quanto à sua correlação (Anexos 7 a 10).

Nota-se que as únicas correlações significativas presentes em todas as dietas dos machos foram entre Colesterol Total e Colesterol não-HDL e entre Peso e Consumo, ambas tendo correlação positiva, ou seja, as variáveis são diretamente proporcionais.

Isso nos leva a concluir que embora os animais das diferentes dietas tenham apresentado diferentes consumos e ganho de peso ao longo do experimento (Tabela 5.26), não existiu correlação direta significativa entre estas variáveis e o teor de colesterol plasmático.

O aumento do colesterol plasmático está ligado ao aumento do colesterol transportado por lipoproteínas LDL e VLDL.

5.11.5. Digestibilidade Verdadeira

Um dos mecanismos que poderia explicar a razão da queda do colesterol nos animais que consumiram dieta com isolado protéico de amaranto, seria a menor

digestibilidade da proteína de origem vegetal, que passaria então a agir como a fibra alimentar, ligando esteróis neutros e ácidos biliares.

Através de comparações múltiplas de Bonferroni (Anexo 6), conclui-se que apenas a dieta controle tem digestibilidade diferente das outras rações. Todas as rações têm digestibilidade verdadeira próxima a 100% , o que nos leva a concluir que a proteína de amaranto não tem efeito fibra por não estar sendo completamente digerida (Figura 5.25).

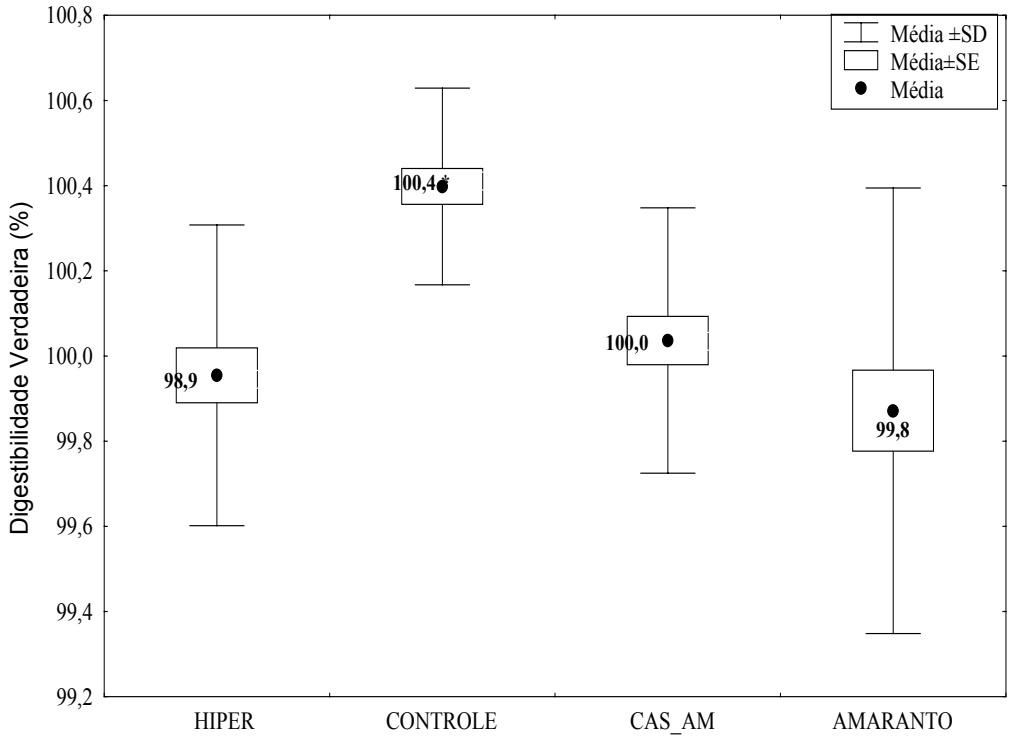


Figura 5.25. Representação gráfica da Digestibilidade Verdadeira (%) da proteína presente nas diferentes rações utilizadas no experimento Principal.

Embora os resultados de digestibilidade sejam diferentes do encontrado por outros autores, 82% para o *A. caudatus* (IMERI *et al*. 1987) 89,8% e 85,5% para *A. cruentus* extrusado e pipocado (BRESSANI *et al*. 1993) e 82% para amostra crua desengordurada (GARCIA *et al*. 1987), é importante frisar que no presente trabalho a avaliação da digestibilidade protéica deu-se com isolado protéico. Durante a produção do isolado, a proteína passa por várias etapas que podem ter proporcionado sua maior digestibilidade, como a desnaturação, eliminação de outros componentes que deixariam a proteína menos disponível à ação enzimática, entre outras.

5.11.6. Teores de Ácidos Biliares e Colesterol nas Fezes

Um dos mecanismos que explica a redução do colesterol plasmático por ação das proteínas de origem vegetal, como a soja, é o aumento da excreção de ácidos biliares e colesterol nas fezes, em dietas isentas de colesterol, em ratos ou coelhos (BEYNEN 1990; HUFF e CARROL 1980).

No presente trabalho (Tabela 5.28), isto foi observado para a excreção do colesterol, com os maiores níveis excretados acompanhando as maiores reduções nos níveis de colesterol plasmático. No entanto, para a excreção de ácidos biliares, o oposto foi observado para as dietas experimentais, se comparar-se as dietas mais indutoras de hipercolesterolemia (Controle e Hiper) com as que provocaram hipocolesterolemia (CAS+AM e AM).

KUYVENHOVEN *et al.* (1986) relatam que quando a caseína foi introduzida em substituição à dieta contendo proteína de soja, a excreção de ácidos biliares e de colesterol nos três primeiros dias foi reduzida em 43 e 25%, respectivamente, antes que ocorresse a redução do colesterol sérico. Isto leva a concluir que a diminuição na excreção de colesterol é uma das causas primárias da hipercolesterolemia em coelhos, e não um efeito secundário, ou seja, da diminuição da captação de LDL, com conseqüente menor disponibilidade de colesterol para ser excretado na bile.

Tabela 5.28 – Peso das fezes e teor de ácidos biliares e colesterol nas fezes dos hamsters do experimento Principal.

	Hiper	**Controle**	**CAS+AM**	**Amaranto**
Peso das Fezes Secas (g/dia)	0,437 a (±0,06)	0,567 b (±0,08)	0,523 ab (±0,14)	0,411 a (±0,13)
Somatório das Fezes Excretadas – 3 dias (g)	1,305 a (±0,19)	1,702 b (±0,20)	1,568 ab (±0,22)	1,232 a (±0,40)
AcB (µmol/g de fezes)	2,46 a (±0,50)	2,71 a (±0,42)	1,48 b (±0,57)	1,47 b (±0,53)
Total AcB excretados (µmol/3dias)	3,18 a (±0,67)	4,60b (±0,89)	2,26 ac (±0,70)	1,84 c (±1,07)
Colesterol (g/100g de fezes)	0,424 a (±0,24)	0,826 a (±0,35)	1,452 b (±0,63)	1,232 c (±0,40)
Total de Colesterol excretados (mg/3dias)	5,57 a (±3,07)	14,37 b (±6,38)	22,26 bc (±9,99)	30,46 c (±13,22)

AcB= Ácidos Biliares

As médias em mesma linha, seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si através de Teste de Tukey (Assistat 7.3 Beta) ($p<0.05$)

A quantidade de fezes excretadas (peso seco) foi superior para o grupo controle, só igualando-se à excreção do grupo CAS+AM, enquanto o grupo Hiper, CAS+AM e AM não diferiram entre si.

Os animais alimentados com dieta contendo exclusivamente caseína (Hiper e Controle) tiveram maior excreção de ácidos biliares por grama de fezes, que os alimentados com dieta contendo proteína do amaranto (CAS+AM e AM). No entanto, quando se considera a excreção total de ácidos biliares, o grupo Controle foi superior aos outros, enquanto os animais do grupo CAS+AM igualaram-se ao grupo Hiper e ao AM, ao passo que este último manteve-se com menor excreção dentre os grupos.

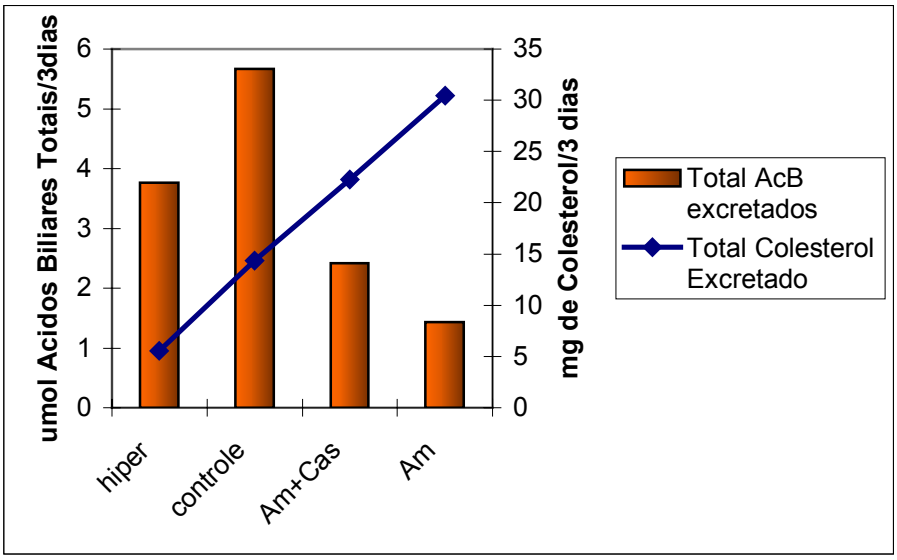


Figura 5.26. Representação gráfica do colesterol e ácidos biliares excretados nas fezes de animais do experimento Principal.

Isto é o contrário do esperado, pois uma menor eliminação e o concomitante aumento na captação de ácidos biliares deveria levar a uma hipercolesterolemia, uma vez que o aumento na chegada de colesterol no fígado levaria a uma diminuição da síntese de ácidos biliares a partir do colesterol, provocando seu acúmulo e diminuição da síntese de receptores para LDL (KUYVENHOVEN *et al.* 1986). Estes autores sugerem que a redução da excreção de esteróis nos coelhos alimentados com caseína seria a causa da hipercolesterolemia e não a conseqüência.

A maior excreção de ácidos biliares estaria relacionada a algum ligante intestinal (VAHOUNY *et al*. 1980) ou a maior retenção dos mesmos devido à viscosidade do meio (TURLEY *et al*. 1991) assim como ocorre com fibras solúveis, no intestino delgado. Além disso, poderia ser resultado de um aumento na síntese de ácidos biliares, que também ocorre como mecanismo de ação hipocolesterolemizante das fibras (MOUNDRAS *et al*. 1997). No entanto, em alguns relatos, não foi observado aumento da excreção de ácidos biliares nas fezes nestas dietas redutoras de colesterol (ARJMANDI *et al*. 1992; CARR *et al*. 2003).

De modo similar aos resultados encontrados no presente estudo, CARR *et al*. (2003) observaram em experimentos com ratos e hamsters que uma fibra não fermentável e que produzia alta viscosidade no intestino, aumentou consideravelmente a excreção de esteróis neutros ao passo que a excreção de ácidos biliares não foi afetada e inclusive diminuiu em alguns tratamentos. Este fato, no entanto, não teve qualquer influência na colesterolemia dos animais.

Em revisão de estudos clínicos sobre os efeitos da soja na diminuição do colesterol, CARROLL (1991) cita que a substituição da caseína pela proteína da soja aumenta a excreção de esteróis fecais e a taxa de captação de colesterol em coelhos. FUMAGALLI *et al.* (1982), por sua vez, não encontraram diferenças na excreção de ácidos biliares e colesterol em humanos.

5.12. Experimento Aminoácidos

5.12.1. Consumo de Dieta e Peso dos Animais

A ingestão total durante as quatro semanas do experimento (3 semanas para grupo hipercolesterolemizante), consumo diário médio, ganho de peso durante o experimento e coeficiente de eficácia alimentar relativo as dietas hipercolesterolemizante (Hiper), contendo 20% de caseína (Controle), caseína adicionada de arginina (CAS+ARG), dieta simulando o perfil de aminoácidos da caseína (AA CAS) e dieta simulando o perfil de aminoácidos do isolado protéico de amaranto (AA AM), estão apresentados apresentado na Tabela 5.29.

Para todos os parâmetros avaliados na Tabela 5.29 não houve diferença significativa entre as dietas. Apesar disso, observou-se uma tendência do ganho de

peso e de menor coeficiente de eficácia alimentar para os animais alimentados com dieta AA AM.

Em uma revisão de seus experimentos, CARROL e KUROWSKA (1995) relatam que em geral os animais perdiam ou ganhavam pouco peso quando alimentados com rações contendo aminoácidos livres, no entanto relatam que não observaram qualquer relação entre o peso corpóreo e a concentração sérica de colesterol.

Tabela 5.29. Ingestão de dieta diária, ganho de peso e coeficiente de eficácia alimentar para hamsters alimentados com diferentes dietas no experimento Aminoácidos

	Hiper	Controle	CAS+ARG	AA CAS	AA AM
Peso Ganho (g)	**41,56 a** (± 11,22)	**24,64 b** (± 13,43)	**25,94 b** (± 5,30)	**21,98 b** (± 7,99)	**17,53 b** (± 9,86)
Ingestão Total de Dieta (g)	**157,61 a** (± 17,53)	**193,26 b** (± 20,34)	**195,77 b** (± 22,44)	**201,87 b** (± 13,35)	**189,57 b** (± 19,36)
Consumo Diário Médio (g)	**7,50 a** (± 2,07)	**7,40 a** (± 0,78)	**8,28 b** (± 0,85)	**7,93 ab** (± 0,49)	**7,74 ab** (± 0,66)
CEA(%)	**26,64 a** (± 7,29)	**12,33 b** (± 5,94)	**13,47 b** (± 3,46)	**10,74 b** (± 3,29)	**8,94 b** (± 4,45)

CEA: Coeficiente de eficácia alimentar= peso ganho/ingestão de alimentos x100
As médias em mesma linha, seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si através de Teste de Tukey (Assistat 7.3 Beta) ($p<0.05$)

5.12.2. Peso do Fígado

O peso do fígado dos animais alimentados com a dieta CAS+ARG foi significativamente maior do que o dos animais alimentados com as outras dietas. No entanto, quando o peso do fígado foi dividido pelo peso do animal, os mesmos eram proporcionalmente iguais para todos os animais (Tabela 5.30).

Tabela 5.30. Peso do fígado dos hamsters do experimento Aminoácidos

	Controle	CAS+ARG	AA CAS	AA AM
Peso do Fígado (g)	**5,35 a** (± 1,06)	**6,72 a** (± 1,15)	**5,54 ab** (± 0,62)	**4,81 b** (± 0,81)
Peso Fígado/ Peso do Animal (%)	**4,65 a** (±0,84)	**4,53 a** (±0,37)	**4,27 a** (±0,28)	**3,90 a** (±0,44)

As médias em mesma linha, seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si através de Teste de Tukey (Assistat 7.3 Beta) ($p<0.05$)

Os animais alimentados com a dieta AA AM mostraram uma tendência a apresentar o fígado menor, embora não estatisticamente diferente.

5.12.3. Perfil Lipídico

Para verificar se houveram variações dos níveis plasmáticos foi necessária a utilização de três análises de variância (NETER *et al*. 1996) diferentes, devido à forma pela qual os dados foram coletados. Análises estatísticas foram realizadas considerando quatro variáveis plasmáticas: colesterol total, triglicérides, HDL-c e colesterol não-HDL (soma de colesterol contido em LDL e VLDL). Para os casos de rejeição de hipótese de igualdade das médias, foram realizadas comparações múltiplas de Bonferroni (NETER *et al*. 1996), de forma semelhante à descrita no experimento Principal.

De acordo com análise de variância (Anexo 11) o colesterol não-HDL (LDL-C+HDL-C) da quarta semana é que não diferiu significativamente entre as dietas e em relação ao período basal.

Embora exista uma tendência de redução do colesterol total da dieta contendo Aminoácidos que simulem o perfil de da proteína presente no isolado protéico de amaranto, esta não foi estatisticamente significativa (Anexos 11 a 14). Portanto, as Figuras 5.27 a 5.30 mostram as tendências do perfil lipídico frente às dietas.

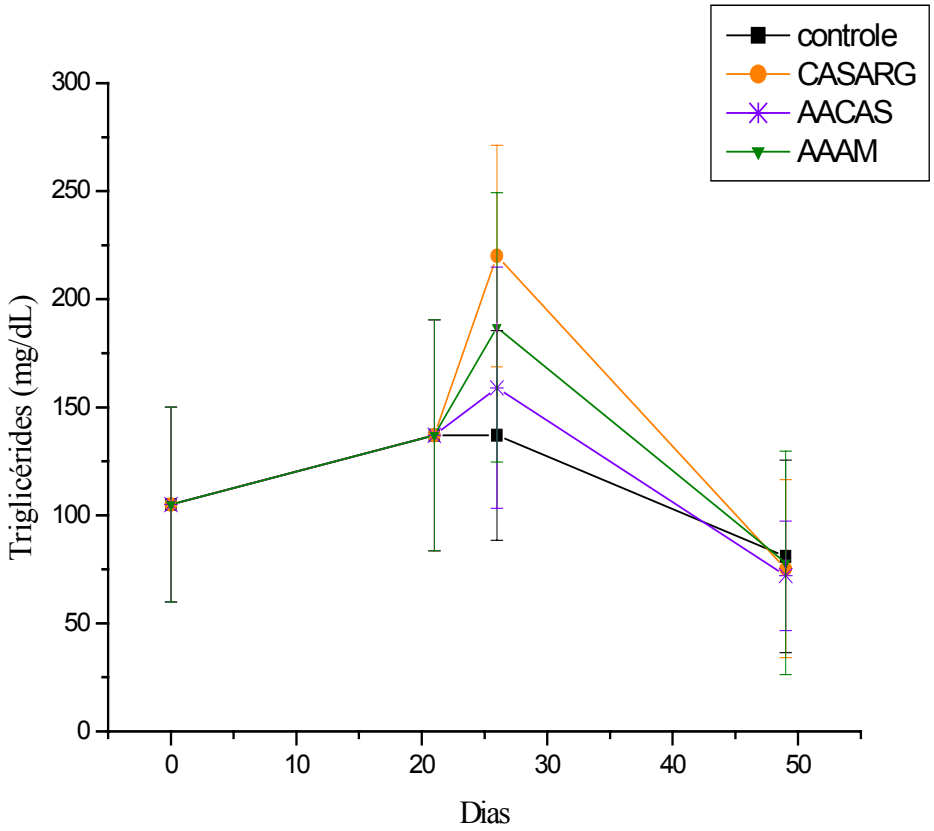


Figura 5.27. Representação gráfica do teor de triglicérides no plasma de hamsters diferentes momentos (0 Dias: após adaptação dos animais ao biotério; 21 Dias: após 3 semanas de dieta hipercolesterolemizante; 26 dias: após 5 dias das dietas experimentais; 49 Dias: após 28 dias das dietas experimentais) do experimento Aminoácidos.

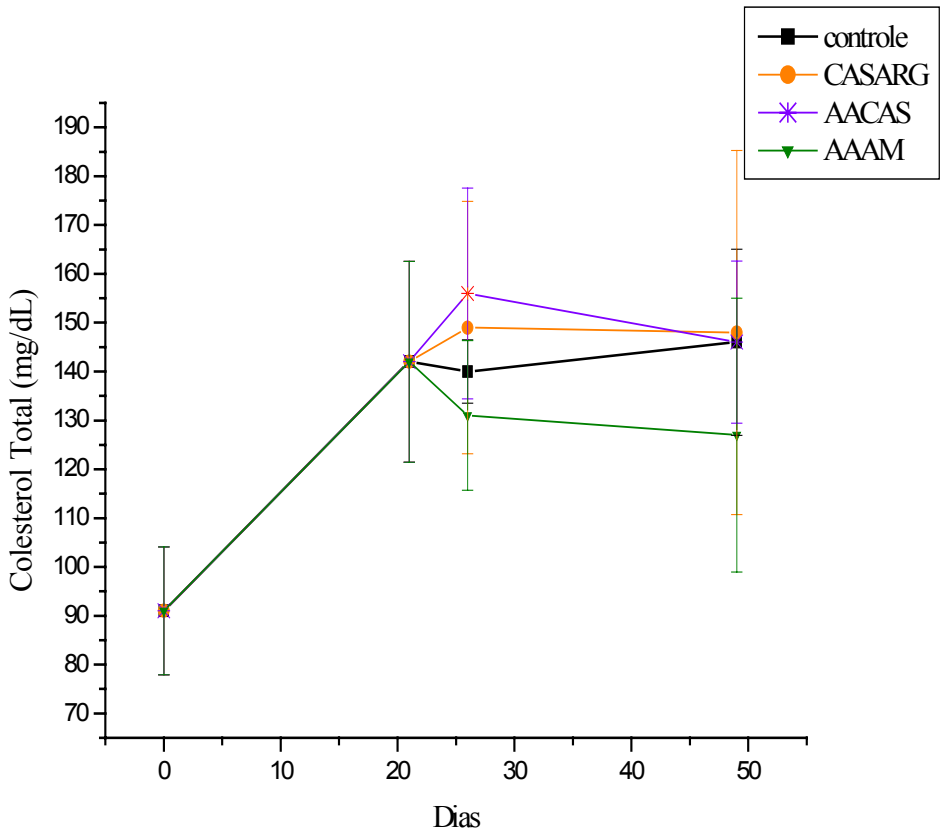


Figura 5.28. Representação gráfica colesterol total no plasma de hamsters nos diferentes momentos (0 Dias: após adaptação dos animais ao biotério; 21 Dias: após 3 semanas de dieta hipercolesterolemizante; 26 dias: após 5 dias das dietas experimentais; 49 Dias: após 28 dias das dietas experimentais) do experimento Aminoácidos.

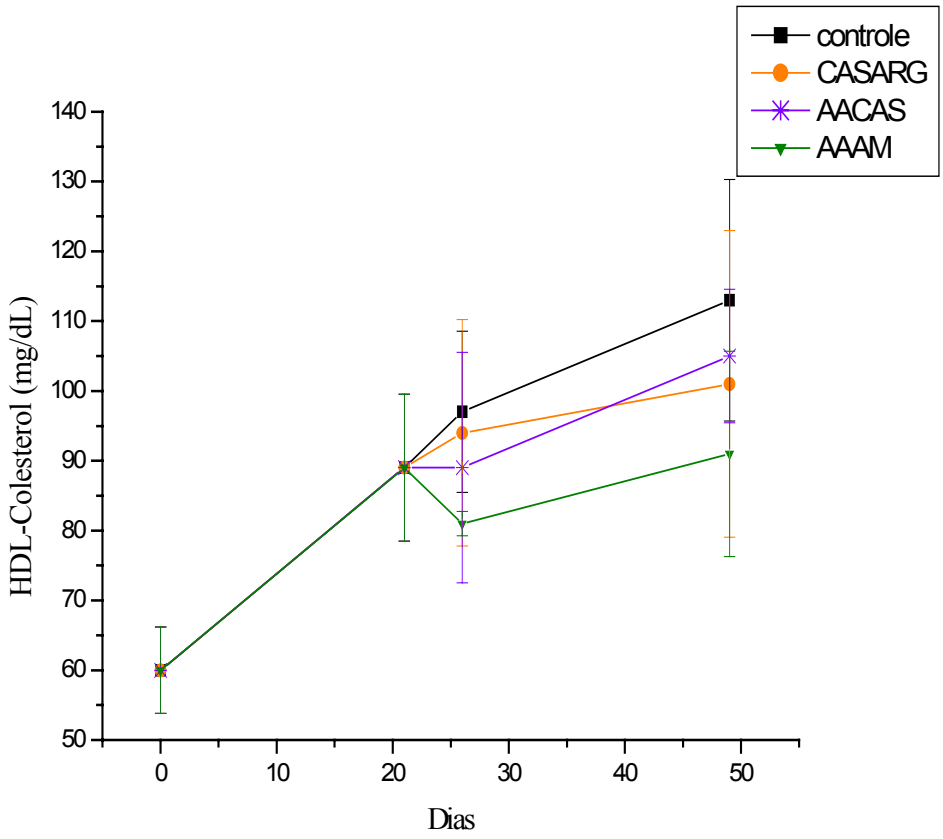


Figura 5.29. Representação gráfica HDL-Colesterol no plasma de hamsters nos diferentes momentos (0 Dias: após adaptação dos animais ao biotério; 21 Dias: após 3 semanas de dieta hipercolesterolemizante; 26 dias: após 5 dias das dietas experimentais; 49 Dias: após 28 dias das dietas experimentais) do experimento Aminoácidos.

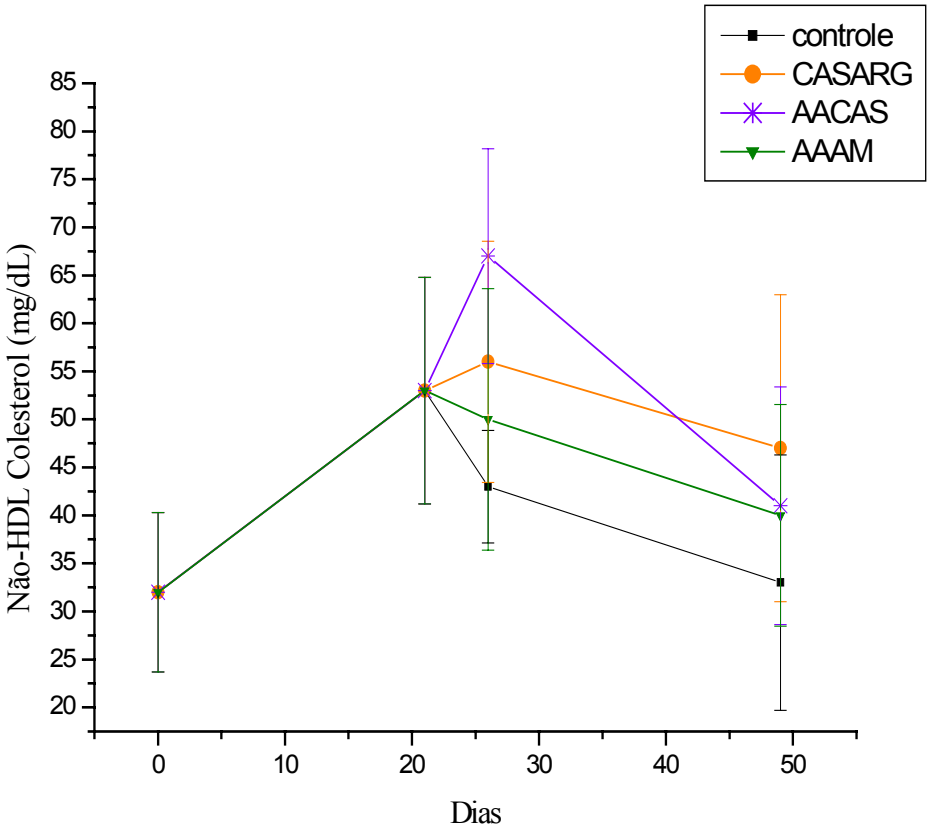


Figura 5.30. Representação gráfica do Colesterol não-HDL (VLDL-c + LDL-c) no plasma de hamsters nos diferentes momentos (0 Dias: após adaptação dos animais ao biotério; 21 Dias: após 3 semanas de dieta hipercolesterolemizante; 26 dias: após 5 dias das dietas experimentais; 49 Dias: após 28 dias das dietas experimentais) do experimento Aminoácidos.

A concentração de colesterol plasmático alcançado após dieta hipercolesterolemizante foi diferente do período basal. Após uma semana de dietas experimentais, todas diferiram do período basal, mas se mostraram ainda semelhantes ao período em que estavam hipercolesterolemizados. Esta diferença em

relação ao basal permaneceu até a quarta semana para todos os tipos de dieta, com exceção dos animais alimentados com dieta AA AM que tiveram o teor de colesterol semelhante ao teor do período basal. Apesar da maior eficácia da dieta AA AM em reduzir o nível de colesterol ao valor basal, esse efeito não foi significativo estatisticamente. O nível de colesterol total dos animais alimentados com dieta AA AM foi 17% inferior ao grupo AA CAS (considerado seu controle). Enquanto que, a redução de colesterol total do grupo com isolado protéico de amaranto do experimento principal foi de 48% em relação ao controle.

Trabalhos pioneiros realizados em laboratório mostraram que dieta contendo mistura de aminoácidos nas proporções encontradas na caseína provocava em coelhos o mesmo nível de hipercolesterolemia que a dieta contendo caseína. No entanto, a mistura de aminoácidos que corresponderia à proteína de soja foi mais hipercolesterolemizante que a proteína integral (CARROL e KUROWSKA, 1995).

Como observado no experimento hipercolesterolemizante para fêmeas (item 5.9), a comparação entre os efeitos observados entre machos e fêmeas podem ser comparados em termos de colesterol não-HDL. A dieta AA AM apresentou nível de colesterol não-HDL 36% inferior ao grupo AA CAS, mas foi maior quando comparado ao grupo controle com caseína integral. O grupo com isolado protéico de amaranto do experimento principal teve redução de 56% da fração não-HDL em relação ao seu controle em relação ao controle.

O colesterol não-HDL na primeira semana apenas a dieta AA CAS apresentou nível superior ao período basal, nem mesmo a dieta hiper consegui elevar o colesterol não-HDL de forma significativa estatisticamente. Ao final da quarta

semana todas as dietas, com exceção da AA Am (que permaneceu igual ao período basal durante todo experimento), induziram níveis significativamente menores desta variável (Anexo 12). Novamente, os resultados não foram significativamente diferentes entre si neste efeito na quarta semana, ou entre a dieta hiper ou período basal (Anexo 13).

De forma similar, o teor de colesterol da HDL diferiu do período basal, em todas as dietas, tanto na primeira, quanto na quarta semana, com exceção do grupo alimentado com a dieta AA AM. No entanto, a dieta AA AM não foi diferente das outras dietas experimentais, nem tampouco da dieta hipercolesterolemizante, nesta variável.

A dieta AA da CAS teve redução significativa dos níveis de Colesterol Total e do colesterol da HDL, quando se compara a quarta com a primeira semana. Já o teor de triglicérides teve diminuição significativa da primeira para quarta semana nos animais dos grupos AA AM e AA CAS. E o colesterol não-HDL diminuiu para todas as dietas, com exceção da AA AM, que permaneceu sempre semelhante ao basal, para este grupo.

Embora a diminuição na colesterolemia provocada pelo AA AM já tenha sido importante na primeira semana, e não havendo diferença significativa em relação à quarta semana (Anexo 14), verificamos que o valor de colesterol total só volta a ser semelhante ao teor basal após quatro semanas de dieta, portanto, existe uma melhora do quadro quando a dieta é mantida por todo o período. Em relação aos triglicérides observa-se também um benefício ao manter-se a dieta até a quarta semana.

Acredita-se que a razão lisina/arginina de uma proteína possa ser um importante determinante de sua aterogenicidade. Assim, quanto maior essa razão, maior seria o efeito aterogênico da proteína (KRITCHEVSKY 1982). A arginina está relacionada com a liberação de glucagon e insulina e, também, com o aumento da concentração de apolipoproteína E no sangue, que é responsável pela captação eficiente dos quilomícrons remanescentes (VAHOUNY *et al*. 1985).

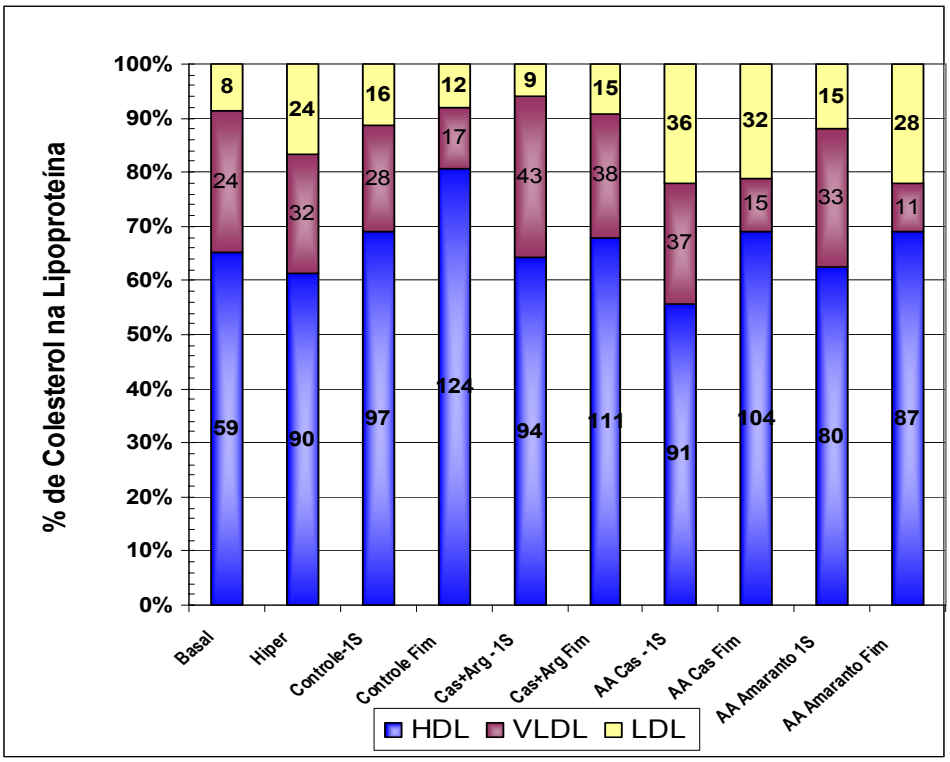


Figura 5.31. Distribuição do colesterol nas diferentes lipoproteínas dos animais do experimento Aminoácidos, de acordo com a dieta e momento da coleta (os números assinalados nas barras referem-se aos valores colesterol expressos em mg/dL da respectiva fração lipoprotéica).

VAHOUNY *et al*. (1985) verificaram que a adição de arginina à caseína para modificar sua razão lisina/arginina que é de 2,0, resultava num efeito menos aterogênico sobre os níveis lipídicos de coelhos. Por outro lado, estudo semelhante foi realizado por SUGANO *et al*. (1982) onde foi verificado que a adição de arginina à caseína não alterava seu efeito aterogênico.

Neste trabalho a adição de arginina foi deletéria, aumentando os teores de colesterol total e triglicérides. Não há, no momento, uma explicação para tal efeito. GIROUX *et al.* (1999) citam que o efeito anti-hipercolesterolemizante da arginina só pode ser observado quando há altos níveis de colesterol sérico.

5.12.4. Correlação entre Variáveis Plasmáticas e de Consumo

As variáveis peso do animal, consumo de dieta, bem como as variáveis plasmáticas foram comparadas quanto à sua correlação através do teste de Correlação de Pearson e os resultados são apresentados nos Anexos 15 a 19.

Entre as fêmeas, não há uma correlação que esteja presente em todas as dietas consumidas.

5.12.5. Análises nas Fezes

A média da excreção diária, o somatório da excreção de fezes dos 3 dias em que foram coletadas, e a excreção de ácidos biliares não diferiram entre os grupos (Tabela 5.31).

Tabela 5.31 - Peso das fezes e teor de ácidos biliares nas fezes dos hamsters do experimento Aminoácidos.

	Controle	CAS+ARG	AA da Caseína	AA do Amaranto
Peso das Fezes (g/dia)	**0,494 a** (±0,07)	**0,582 a** (±0,11)	**0,509 a** (±0,13)	**0,480 a** (±0,12)
Somatório das Fezes Excretadas - 3 dias (g)	**1,482 a** (±0,22)	**1,718 a** (±0,37)	**1,527 a** (±0,39)	**1,440 a** (±0,34)
AcB (umol/g de fezes)	**2,930 a** (±0,81)	**3,140 a** (±0,05)	**2,778 a** (±0,24)	**3,020 a** (±0,11)
Total AcB excretados (umol/3dias)	**4,381 a (± 1,15)**	**5,395 a (±1,19)**	**4,236 a (±1,10)**	**4,347 a (±1,08)**
Colesterol (g/100g de fezes)	**0,212 a** (±0,13)	**0,067 b** (±0,024)	**0,136 ab** (±0,045)	**0,147 ab** (±0,066)
Total de Colesterol excretados (mg/3dias)	**3,061 a** (±1,84)	**1,190 a** (±0,58)	**2,280 a** (±0,81)	**2,205 a** (±1,44)

AcB= Ácidos Biliares ; Valores entre parênteses representam o desvio padrão.

As médias em mesma linha, seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si através de Teste de Tukey (Assistat 7.3 Beta) ($p<0.05$)

Quanto à excreção de colesterol, que foi afetada quando a proteína de amaranto foi administrada no experimento Principal, não houve diferença na excreção total nos três dias de coleta no experimento onde foram usados aminoácidos livres simulando a composição das proteínas utilizadas no experimento principal. No

entanto, a concentração de colesterol (em g/100g de fezes) foi menor no grupo CAS+ARG. De forma similar, no experimento principal existiu uma tendência de que os animais com mais elevados teores de colesterol total e colesterol não-HDL no plasma, tivessem a concentração de colesterol nas fezes menores.

Quando misturas de aminoácidos substituem a proteína integral, os efeitos na excreção de ácidos biliares (POTTER 1995) e colesterol (KUROWSKA e CARROLL 1990) nas fezes não são observados, mesmo havendo alterações nos teores plasmáticos de colesterol.

5.13. Discussão sobre Possíveis Mecanismos

Numerosas tentativas têm sido feitas para explicar os mecanismos pelos quais a proteína e os aminoácidos poderiam alterar a concentração plasmática de colesterol total e colesterol de LDL (BEYNEN 1990; CARROL 1991). POTTER (1995) fez importante revisão sobre estes mecanismos, e cita que os três possíveis são: 1) aumento da excreção de ácidos biliares; 2) efeitos no metabolismo hepático do colesterol, afetando a atividade da enzima HMG-CoA redutase; 3) efeitos endócrinos, envolvendo insulina, glucagon e hormônios tireoidianos.

Quando coelhos foram alimentados com proteína de soja notou-se que a principal alteração ao nível hormonal foi a diminuição da relação insulina:glucagon.

Isto porque, uma baixa relação de lisina/arginina diminui a secreção de insulina e aumenta a de glucagon. A relação inversa, ou seja, alto teor de insulina/glucagon é estimulante da lipogênese e, portanto, aumenta o risco de doença cardiovascular (POTTER 1995). Em experimentos em hamsters, o nível de insulina não diferiu entre os animais alimentados com proteína de soja e caseína (YEH *et al*. 1998).

FORSYTHE *et al.* (1991) em experimentos com hamsters, relataram que há aumento nos níveis do hormônio tireodiano T_4 sem alteração do T_3 quando alimentados com dieta contendo 25% de proteína de soja, em comparação à dieta contendo caseína. E que esta alteração hormonal precede o início da alteração plasmática dos níveis de colesterol. FORSYTHE (1995) revisou diversos trabalhos onde o mesmo efeito sobre o aumento dos níveis plasmáticos de T_4 e colesterol, em diversas espécies animais e em humanos, é relatado quando proteína de origem vegetal substitui a caseína. O autor propôs ser este o que o mecanismo de ação da proteína, pois todas as alterações que ocorrem nesta dieta com proteína vegetal ocorreriam quando o aumento de T_4 é induzido por outros meios em humanos e animais. Estas alterações seriam: aumento da atividade da enzima HMG CoA redutase, aumento na síntese e excreção de ácidos biliares, diminuição da síntese hepática da apolipoproteína B-100 e aumento do *clearance* da LDL e VLDL. Além disso, em animais tireoidectomizados, com suplementação de T_4 a diferença a estimulação da dieta com caseína ou proteína de soja foi muito menor do que em animais contendo uma tireóide apta a ser estimulada.

KHOSLA *et al.* (1991) apontam que a síntese da apolipoproteína B, presente na LDL, é estimulada pela dieta contendo caseína, e experimentos

subseqüentes indicaram que a diminuição na atividade de receptores LDL precede o aumento do colesterol sérico (KHOSLA *et al.* 1991). O consumo de proteína de soja estaria associado com aumento da remoção de LDL e VLDL pelos hepatócitos (KHOSLA *et al*. 1991; LOVATI *et al*. 1992).

Vários outros estudos compararam proteína de soja e caseína, e também aminoácidos tidos como indutores ou não da hipercolesterolemia. As únicas diferenças marcantes foram no efeito da diminuição da atividade dos receptores LDL no fígado e síntese de apo B. Além disso, vários estudos relatam que há um aumento na atividade da HMG-CoA redutase em ratos e coelhos alimentados com proteína de soja (CARROLL e KUROWSKA, 1995). Portanto, o efeito da proteína ocorre no fígado e não na absorção do colesterol.

O mecanismo de aumento da excreção fecal de ácidos biliares e esteróis neutros pelas fezes, proposto por HUFF e CARROL (1980), foi verificado principalmente em coelhos e ratos, sendo em humanos os resultados menos consistentes (POTTER, 1995). BEYNEN *et al*. (1985) sugerem que a proteína de soja agiria como fibra na redução do colesterol sérico, interrompendo a reabsorção e recirculação entero-hepática de sais biliares. Sugerem que a ativação dos receptores LDL seria apenas um efeito secundário, semelhante ao que ocorre com as resinas trocadoras de ânions.

SUGANO e KOBA (1993) *apud* POTTER (1995) concluíram que uma fração indigerível da proteína de soja tem efeito hipocolesterolemizante em ratos alimentados com dieta rica em colesterol ou isenta do mesmo. Quando esta fração indigerível foi submetida a um processo de digestão e administrada aos animais, o

efeito hipocolesterolemizante foi reduzido. Uma das hipóteses sugeridas seria que uma seqüência de peptídeos poderia alterar a absorção de colesterol e ácidos biliares. SUGANO *et al*. (1990) relataram que esta fração indigerível foi capaz de aumentar a excreção fecal de esteróis neutros em 65-95% e de ácidos biliares em 80-170% quando comparado à proteína de soja integral.

Quando esta fração protéica indigerível de alto peso molecular (HMF) foi desengordurada com metanol (duas vezes por 1 hora em temperatura ambiente), a capacidade de aumentar a excreção de esteróis nas fezes desapareceu, tanto no grupo tratado com o peptídeo, quanto o tratado com o extrato; e a capacidade de reduzir colesterol plasmático também não foi tão intensa, quanto no hidrolisado antes da extração. Como mesmo após a reconstituição de uma fração em outra, nem a capacidade hipocolesterolemizante nem a excreção de esteróis fossem semelhantes à da HMF, imagina-se que o processamento tenha interferido desnaturando os peptídeos o que resultou em menor capacidade de ligar ácidos biliares (SUGANO *et al*. 1990).

No entanto, em estudos clínicos, embora a proteína de soja tenha sido eficiente na redução da colesterolemia não houve concomitante aumento da excreção fecal de ácidos biliares e/ou colesterol nas fezes (FUMAGALLI *et al*. 1982). Além disso, LOVATI *et al.* (1992) criticam os resultados de SUGANO *et al. (*1990) com base no fato de que os testes de ligação de ácidos biliares *in vitro* apresentaram valores que representariam 25% da atividade da ligação que qualquer medicação antiácida faria, sendo que estes medicamentos não são tidos como hipocolesterolemizantes.

Quando animais são alimentados com diferentes globulinas, espera-se que estas sofram digestão enzimática, no entanto, sabe-se que, em ratos, peptídeos com relativamente alto peso molecular (6 a 25 kDa) atravessam a barreira intestinal e alcançam a corrente sanguínea (BLOCH *et al*. 1988). Já foram encontrados anticorpos anti- 11S e 7S em bezerros e humanos (BURKS *et al*. 1988 apud LOVATI *et al*. 1992). Ambas as globulinas apresentam frações com peso molecular 28 a 35 kDa.

LOVATI *et al*. (1992) sugerem que a ativação do receptor LDL e aumento da degradação da LDL nas células hepáticas, principalmente induzida pela globulina 7S da soja, e em menor intensidade pela globulina 11S, pode estar relacionada com o modo como a soja produz hipocolesterolemia.

LOVATI *et al*. (1991) encontraram em um extrato alcoólico de proteína texturizada de soja com ação hipocolesterolemizante, uma fração protéica com peso molecular de 31 kDa. Este extrato exercia potente estimulação na expressão dos receptores para β-VLDL nos hepatócitos de camundongos alimentados com uma dieta rica em colesterol.

HUFF *et al.* (1977) *apud* CARROLL E KUROWSKA (1995) relataram que coelhos alimentados com caseína e proteína de soja hidrolisada apresentam concentração plasmática de colesterol semelhante àquelas dos animais alimentados com suas respectivas proteínas integrais.

NAGAOKA *et al.* (1999) estudando o efeito de hidrolisado protéico de soja em ratos e em cultura de células Caco-2 (semelhantes às do intestino delgado), concluíram que dois mecanismos estão envolvidos na hipocolesterolemia de

hidrolisados protéicos: a) ligação de ácidos biliares inibindo sua reabsorção no íleo e aumentando sua excreção fecal; b) inibição da solubilidade micelar do colesterol, o que diminui sua absorção no jejuno.

SIRTORI *et al.* (1984) *apud* POTTER (1995) relatam diminuição da atividade de 7 α-hidroxilase em animais alimentados com proteína de soja e aumento da atividade da enzima HMG CoA redutase e receptores B/E. Quando uma mistura de aminoácidos simulando a caseína e proteína de soja foi dada a ratos, a atividade da HMG CoA redutase foi similar às suas respectivas proteínas (NAGATA *et al.* 1982), enquanto que a excreção de ácidos biliares não foi afetada.

Considerando que os níveis de colesterol não-HDL do experimento aminoácidos foi bastante afetado em relação ao controle contendo aminoácidos da caseína, e com ligeira queda nos teores de colesterol total, e sem a interferência na quantidade de esteróis excretados nas fezes, é provável que os aminoácidos simulando o perfil do amaranto afetem o metabolismo do colesterol endógeno, sem interferir na síntese de ácidos biliares, e sua excreção fecal.

Já o pronunciado efeito da proteína de amaranto (48% redução no colesterol total e 56% do colesterol não-HDL), deve-se provavelmente a uma combinação de mecanismos que vão além da simples combinação de aminoácidos; que poderiam ser a interferência na absorção do colesterol e presença de peptídeos biologicamente ativos.

6. CONCLUSÕES

Conclui-se que a proteína de amaranto tem efeito benéfico na redução do colesterol plasmático total, VLDL-C, triglicérides e LDL-C de hamsters com hipercolesterolemia moderada induzida por dieta.

A hipótese de que foi a retirada da caseína e não à adição da proteína de amaranto que teria causado a hipocolesterolemia foi negada, uma vez que se mantendo 20% de caseína (igual à dieta controle) e adicionando-se 10% de proteína de amaranto, alcançou-se também uma redução no colesterol total e colesterol não-HDL, de 26% e 38% respectivamente.

O hamster macho reagiu de forma semelhante ao coelho à indução da hipercolesterolemia provocada pela caseína. Os efeitos observados na distribuição do colesterol nas diferentes lipoproteínas nos levam a confirmar que o hamster é um bom modelo animal para o estudo do impacto da dieta no perfil lipídico, uma vez que quando hipercolesterolemizado reage de forma semelhante a humanos, aumentando principalmente o colesterol não-HDL. As fêmeas reagem com aumento de colesterol total sérico, mas de forma mais sutil (55%), à dieta hipercolesterolemizante, este aumento está associado tanto ao HDL-c (47%) quanto ao colesterol não-HDL(61%).

No processo de isolamento da proteína de amaranto, deixou-se de extrair uma fração de peso molecular de aproximadamente 68 kDa. Houve alteração na proporção de lisina/arginina originalmente presente no grão integral, que era de 0,63 para 0,51. Esta alteração, no entanto, não deveria alterar em muito a ação

hipocolesterolemizante, pois ambos estão abaixo da relação apresentada pela proteína de soja (0,8).

A arginina adicionada à caseína de forma a alcançar a proporção lisina/arginina semelhante à proteína de amaranto não foi capaz de impedir a hipercolesterolemia, pelo contrário, até a incrementou.

A mistura simulando o perfil de aminoácidos do amaranto foi capaz de reduzir (embora não de forma significativa estatisticamente) a hipercolesterolemia contra uma mistura simulando a caseína.

Ainda assim, o pronunciado efeito da proteína de amaranto (48% redução no colesterol total e 56% do colesterol não-HDL), deve-se provavelmente a uma combinação de mecanismos que vão além da simples combinação de aminoácidos, que poderiam ser: a interferência na absorção do colesterol e presença de peptídeos biologicamente ativos.

7. LITERATURA CITADA:

Abell LL, Levy BB, Brodie RB, Kendall, RB. Simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. **J Biol Chem** 1952; 195: 357-366.

Abbott TP, Nakamura LK, Buchholz G, Wolf WJ, Palmer DM, Gasdorf HJ, Nelsen TC, Kleiman R. Processes for making animal feed and protein isolates from jojoba meal. **J Agric Food Chem** 1991. 39: 1488-1493.

Aluko, RE. The extraction and purification of proteins: an introduction. In: Yada, RY, editor. **Proteins in food processing**. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited, 2004. p. 325-351.

Anderson JW. Johnstone, BMD, Cook-Newell, ME. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipid**. N Engl J Med** 1995. 333: 276.

Anderson RL, Wolf WJ. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. **J Nutr** 1995**.** 125: 581S-588S.

Aoyama T, Fukui K, Takamatsu K, Hashimoto Y, Yamamoto, T. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK). **Nutrition** 2000. 16: 349-354.

Arjmandi BH, Ahn J, Nathani S, Reeves RD. Dietary soluble fiber and cholesterol affect serum cholesterol concentration, hepatic portal venous short-chain fatty acid concentrations and fecal sterol excretion in rats. **J Nutr** 1992;122:246–53.

Association Official Analytical Chemists (AOAC). **Official methods of analysis**. Washington, 1993.

AOCS. Trans unsaturated fatty acids by capillary column gas chromatography (Recommended Practice Ch 2a -94). In**: Official methods and recommended practices of the american oil chemists` society**, 5th ed. Firestone, D. Ed. Champaign: American Oil Chemists` Society: 1998.

AOCS. Determination of cis and trans fatty acids in hydrogenated and refined oils and fats by capillary GLC (AOCS Official Method Ce 1f-96). In: **Official methods and recommended practices of the american oil chemists` society**, 5th ed. Firestone, D. Ed. Champaign: American Oil Chemists` Society: 1998.

Bacchi LC, Batistuti JP. Efeito do desengorduramento da farinha de grão-de-bico (Cicer arietinum L) por diferentes solventes orgânicos na solubilidade de proteínas**. Rev Cienc Farm** 1994 15:61-74.

Becker R, Wheeler EL, Lorenz K, Stafford AE, Grosjean OK, Betschart AA, Saundeers RM. A Compositional study of amaranth grain. **J Food Sci**. 1981; 46: 1175-1180.

Becker R. Preparation, composition and nutritional implications of amaranth seed oil. **Cereal Foods World** 1989; 34(11): 950-953.

Bell, DJ, Hoare M, Dunnill P. The formation of protein precipitates and their centrifugal recovery. **Adv Biochem Eng.Biotechnol** 1983. 26: 1-72.

Berganza BE, Moran AW, Rodriguez GM, Coto NM, Santamaría M, Bressani R. Effect of variety and location on the total fat, fatty acids and saqualene content of amaranth. **Plant Foods Human Nutr** 2003; 58:1-6.

Betschart AA, Irving DW, Shepherd AD, Saunders RM. Amaranthus cruentus: milling characteristics, distribution of nutrients within seeds components, and the effects of temperature on nutrition quality. **J Food Scie** 1981; 46:1181-1187.

Berger A, Gremand G, Baunigartener M, Rein D, Monnard I, Kratky E, Geiger W, Burri J, Dionisi F, Allan M, Lambelet P. Cholesterol-lowering properties of amaranth grain and oil in hamsters**. Int J Vitam Nutr Res** 2003a; 73(1): 39-47.

Berger A, Monnard I, Dionisi F, Gumy D, Hayes KC, Lambelet P. Cholesterol-lowering properties of amaranth flakes, crude and refined oils in hamsters. **Food Chem** 2003b; 81:119-124.

Beynen AC. Comparison of the mechanisms proposed to explain the hypocholesterolemic effect of soybean protein versus casein in experimental animals. **J Nutr Sci Vitaminol** 1990; 36(10S): S87-93.

Beynen AC, Englesman G D, Scholz KE, West CE. Casein-induced hypercholesterolemia in rabbits: distribution of cholesterol, triclycerides and phospholipids between serum and liver. **Ann Nutr Metab** 1983; 27:117-124.

Beynen AC, Katan MB. Why do polyunsaturated fatty acid lower serum cholesterol? **Am J Clin Nutr** 1985; 42(9): 560-563.

Brenner D, Willians JT. Grain amaranth (*Amaranthus* species). In: Willians, JT. (Ed.). **Underutillized crops: cereals and pseudocereals**. London: Chapman & Hall; 1995. p.128-186.

Bidlack, WR *et al*. **Phytochemicals ans bioactive agents**. Lancaster: Technomic, 2000.

Blaicher FM, Elstner F, Stein W, Mulherjee KD. Rapeseed protein isolated: effect of processing on yield and composition of protein. **J Agric Food Chem** 1983; 31: 358-362.

Bloch KJ, Wright JA, Bishara SM, Bloch MB. Uptake of polypeptide fragments of proteins by rat intestine in vitro and in vivo. **Gastroenterology** 1988; 95: 1272-1278.

Bravo E, Cantafora A, Calcabrim A, Orfu G. Why prefer the golden Syrian hamster to the Wistar rat in experimental studies on plasma lipoprotein metabolism? **Comp Biochem Physiol**.1994; 107B:347-355.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Bioch.** 1976; 248-254.

Bressani R. The proteins of grain amaranth**. Food Rev Int** 1989; 5(1):13-38.

Bressani R, Garcia-Vela LA. Protein fractions in amaranth grain and their chemical characterization. **J Agric Food Chem** 1990; 38: 1205-1209.

Bressani R, Martell ECM de, Godinez CM de. Protein quality evaluation of amaranth in adult humans. **Plant Food Human Nutr** 1993; 43:123-143.

Brousseau ME, Hoeg JM. Transgenic rabbits as models for atherosclerosis research. **J Lipid Res** 1999; 40: 365-375.

Bruni R, Medici A, Guerrini A, Scalia S, Poli F, Muzzoli M., Sacchetti G. Wild Amartathus caudatus seed oil, a nutraceutical resource from ecuadorian flora. **J Agric Food Chem 2001;** 49: 5455-5460.

Bussab WO, Morettin PA. **Estatística Aplicada**. 5 ed. São Paulo: Saraiva; 2004; 526p.

Calbet JA, Maclean DA. Plasma glucagon and insulin responses depend on the rate of appearance of amino acids after ingestion of different protein solutions in humans **J Nutr 2002** 132:2174-2182.

Carr TP, Wood KJ, Hassel CA, Bahl R, Callahher DD. Raising intestinal contents viscosity leads to greater excretion of neutral steroids but not bile acids in hamsters and rats. **Nutr Res** 2003 23: 91-102.

Carroll KK. Review of clinical studies on cholesterol-lowering response to soy protein**. J Am Diet Assoc** 1991; 91(7): 820-827.

Carroll KK, Kurowska EM. Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and human studies. **J Nutr** 1995;125: 594S-597S.

Chatuverti A, Saronjini G, Devi NL. Hypocholesterolemic effect of amaranth seeds (*Amaranthus esculatus*)**. Plant Food Human Nutr** 1993; 44: 63-70.

Chavéz-Jáuregui RN, Silva, MEMP., Arêas JAG. Extrusion cooking process for amaranth (*Amaranthus caudatus* L.). **J Food Sci**, 2000; 65(6): 1009-1015.

Cheung PCK. Plasma and hepatic cholesterol levels and fecal neutral sterol excretion are altered in hamsters fed straw mushroom diets. **J Nutr** 1998**;** 128: 1512-1516.

Csallany AS, Kindom SE, Addis PB, Lee JH. HPLC method for quantitation of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues. **Lipids** 1989; 24 (7) p.645-51.

Daley SJ, Herderick E, Cornhill JF, Rogers KA. Cholesterol-fed and casein-fed rabbit. Models of atherosclerosis. **Atherosclerosis and Trombosis** 1994; 14(1): 95-104.

Damodaran S. **Food proteins and their applications**. Marcel Dekker; 1997.

Danz RA, Lupton JR. Physiological effects of dietary amaranth (*Amaranthus cruentus*) on rats. **Cereal Food World** 1992; 37(7): 489-494.

Dietschy JM. Theorical considerations of what regulates low-density-lipoprotein and high-density-lipoprotein cholesterol. **Am J Clin Nutr** 1997; 65:1281S-1589S.

Dorfman SE, Smith DE, Osgood DP, Lichtenstein AH. Study of diet-induced changes in lipoprotein metabolism in two strains of golden-syrian hamsters. **J Nutr 2003;** 133: 4183-4188.

Drzewiecki J, Delgado-Licon E, Haruenkit R, Pawelzik E, Martin-Belloso O, Park YS, Jung ST, Trakhtenberg S, Gorinstein S. Identification and differences of total proteins and their soluble fractions in some pseudocereals based on electrophoretic patterns. **J Agric Food Chem** 2003; 51:7798-7804.

Duarte-Correia A, Jokl L, Carisson R. Amino acid composition of some *Amaranthus sp* grain proteins and its fractions. **Arch Latinoam Nutr** 1986; 26(3): 466-476.

Dutra-de-Oliveira JE, Marchini JS. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier; 2000.

Early D, Early JC. Tranferencia de tecnologia indigena para la preparacion de la kiwicha (*Amaranthus*). Primera parte. El amaranto y su potencial. **Boletín 1987;** 4: 8-12.

Erickson DR **Practical handbook of soybean processing and utilization**. St. Louis: AOCS Press; 1995. 584 p.

Espondaburu OR, Bassols GB. Mathematical determination of LDL-cholesterol. Comparison with a homogeneous method **Acta Bioquimica Clin Latin** 2002; 36 (2): 215-221.

Esterbauer H *et al*. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Radical Biol Med**, 1992; 13: 341-390.

Food and Agriculture Organization/World Health Organization.. **Protein quality evaluation**. 1991; Roma, 66p. (FAO Food and Nutrition Paper, 51).

Food and Agriculture Organization/World Health Organization. **Report of the FAO/WHO Working Group on Analytical Issues Related to Food Composition and Protein Quality** 2001; FAO Rome, Italy.

Fernandez ML, Wilson TA, Conde K, Vergara-Jimenez M, Nicolosi RJ. Hamsters and guinea pigs differ in their plasma lipoprotein cholesterol distribuition when fed diets varying in animal protein, soluble fiber, or cholesterol content. **J Nutr** 1999; 129: 1323-1332.

Ferreira TAPC. **Avaliação nutricional do amaranto (*Amaranthus caudatus* L.) extrusado em diferentes condições de umidade.** São Paulo; 1999. [Tese de doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

Forsythe WA. Comparison of dietary casein or soy protein effects of plasma lipids and hormone concentrations in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). **J Nutr** 1986**;** 116: 1165.

Forsythe WA, Santell R, Bennink M. Plasma thyroxine and cholesterol changes over time as affected by dietary protein source. **FASEB J** 1991 5: A947 (abs.)

Forsythe WA. Soy protein, thyroid regulation and cholesterol metabolism. **J Nutr** 1995;125: 619S-623S.

Friedewald WT, Fredrick DS, Levy RI. Estimation of concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge **Clin Chem** 1972**;** 18 (6): 499-504.

Fuhrmeister H, Meuser F. Impact of processing on functional properties of protein products from wrinkled peas**. J Food Eng** 2003; 56: 119-129.

Fujihara S, Kasuga A, Aoyagi Y. Nitrogen-to-protein conversion factors for common vegetables in Japan. **J Food Scie** 2001; 66:3, 412-415.

Fukui K, Tachibama N, Fukuda Y, Takamatsu K, Sugano M. Ethanol washing does not attenuate the hypocholesterolemic potential of soy protein. **Nutr** 2004; 20(11-12): 984-990.

Fumagalli R, Soleri R, Farina R *et al*. Fecal cholesterol excretion studies in type II hypercholesterolemic patients treated with the soybean protein diet. **Atherosclerosis** 1982; 43:355-368.

Garcia LA, Alfaro MA, Bressani R. Digestibility and protein quality of raw and heat-processed defatted and nondefatted flours prepared with three amaranth species**. J Agric Food Chem** 1987; 35:604-607.

Gatchalian-Yee M, Arimura Y, Ochiai W, Yamada K, Sugano M. Soybean protein lowers serum cholesterol levels in hamsters: effect of debittered undigested fraction. **Nutrition** 1997; 13: 633-639.

Giroux I, Kurowsha EM, Carroll KK. Role of dietary lysine, methionine, and arginine in the regulation of hypercholesterolemia in rabbits. **J Nutr Biochem** 1999; 10: 166-171.

Gonzalez-Perez S, Merck KB, Vereijken JM, Koningsveld GA van, Gruppen H, Voragen AGJ. Isolation and characterization of undenatured chlorogenic acid free sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. **J Agric Food Chem** 2002; 50: 1713-1719.

Goldstein JL., Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature** 1990; 343: 425-330.

Gorinstein S, Moshe R, Green L, Arruda P. Evaluation of four amaranthus species through protein electrophorectic patterns and their amino acid composition. **J Agric Food Chem 1991** 39:851-854.

Gorinstein S, Delgado-Licon E, Pawelzik E, Permady HH, Weisz M, Trakhtenberg S. Characterization of soluble amaranth and soybean proteins based on fluorescence, hidrophobicity, electrophoresis, amino acid analysis, circular dichroism, and differential scanning calorimetry measurements. **J Agric Food Chem 2001;** 49: 5595-5601.

Gorinstein S, Pawelzik E, Delgado-Licon E, Haruenkit R, Weisz M, Trakhtenberg S. Characterization of pseudocereal and cereal protein by protein and amino acid analyses. **J Sci Food Agric 2002** 82: 886-891.

Graham GG, Lembcke J, Morales E. Pos-prandial plasma aminograms in the assessment of protein quality for Young children: maize and grain amaranth, alone and combined. **Eur J Clin Nutr** 1990; 44:35-43.

Grajeta H. Effects of amaranth (Amaranthus cruentus) seeds on lipid metabolism in rats. **Bromatologia i Chemia Toksykologiczna** 1997; 30:25.

Grundy SM, Abrams JJ. Comparison of actions of soy protein and casein on metabolism of plasma lipoproteins and cholesterol in humans. **Am J Clin Nutr 1983;** 38:245-252.

Gueguen J. Legume seed protein extraction, processing, and end product characteristics. **Qual Plant Plant foods Hum Nutr** 1983; 32: 267-303.

Gylling H, Miettinen TA. Postabsortive metabolism of dietary squalene. **Atherosclerosis** 1994; 106: 169.

Hamada JS. Ultrafiltration of partially hydrolyzed rice bran protein to recover value-added products. **J Am Oil Chem** 2000; 77: 779-784.

Harland BF, Oberleas D. Anion exchange method for the determination of phytate in foods collaborative study. **J AOAC** 1986; 68: 667-670.

Hartman L, Lago RCA. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Pratice** 1973; 494(22): 475-476.

Hayes KC, Khosla P, Kaiser A *et al.* Dietary fat and cholesterol modulate the plasma lipoprotein distribution and production of pigment or cholesterol gallstones in hamsters**. J Nutr** 1992; 122: 374-384.

He HP, Cai V, Sun M, Corke H. Extraction and purification of squalene from *Amaranthus* grain. **J Agric Food Chem** 2002; 50: 368-372.

He HP, Corke H. Oil and squalene in *Amaranthus* grain and leaf. **J Agric Food Chem** 2003; 51: 7913-7920.

Huff MW, Carroll KK. Effect of dietary protein on turnover, oxidation, and absorption of cholesterol, and on steroid excretion in rabbits. **J Lip Res** 1980; 21: 546-558.

Huff M W, Hamilton RMG, Carroll KK. Plasma cholesterol levels in rabbits fed low fat, cholesterol-free, semipurified diets: effects of dietary proteins, protein hydrolysates and amino acid mixtures. **Atherosclerosis** 1977; 28: 187-195.

Hughes JS. Potential contribution of dry bean dietary fiber to health. **Food Technol**. 1991; 45(9):122-126.

Imeri A, Gonzales JM, Flores R, Elias LG, Bressani R. Variabilidad genética, y correlaciones entre rendimiento, tamano del grano, composición química y calidad de la proteína de 25 variedades de amaranto (*Amaranthus caudatus*). **Arch Latinoam Nutr** 1987 (a) 37: 132-146.

Imeri A, Flores R, Elias LG, Bressani R. Efecto do procesamiento y de la suplementacion con aminoácidos sobre la calidad proteinica del amaranto (*Amaranthus caudatus*). **Arch Latinoam Nutr** 1987(b); 37: 160-173.

Irving DW, Betschart AA, Saunders RM. Morphological studies on *Amaranthus cruentus***. J Food Sci**. 1981; 46: 1170-1174.

Kalinowski LS. **El pequeno gigante**. Cusco: UNICEF, 1986; p.1-24.

Kayashita J, Shimaoka I, Nakajoh M. Hypocholesterolemic effecto of buckwheat extract in rats fed cholesterol enriched diets. Nutr Res 1995; 15(5): 691-698.

Kayashita J, Shimaoka I, Nakajoh M, Yamazaki M, Kato, N. Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats because of its low digestibility. **J Nutr** 1997; 127: 1395-1400.

Khosla P, Samman S, Carroll KK, Huff MW. Turnover of ^{125}I-VLDL and ^{131}I-LDL apolipoprotein B in rabbits fed diets containing casein and soy protein. **Biochem Biophys Acta** 1989; 1002 157-163.

Konishi Y, Fumita Y, Ikeda K, Okino K, Fuwa H. Isolation and characterization of globulins seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L. **Agric Biol Chem** 1985; 49(5): 1453-1459.

Kowala MC. Effects of an atherogenic diet on lipoprotein cholesterol profile in the F_1B hybrid hamster. **Atherosclerosis** 1993; 103: 293—294.

Kowala MC, Nunnari JJ, Durham SK, Nicolosi RJ. Doxazosin and cholestyramine similarly decrease fatty streak formation in the aortic arch of hyperlipidemic hamsters. **Atherosclerosis** 1994; 91: 35-49.

Kritchevsky D, Tepper AS, Czarnecki SK, Klurfeld DM. Atherogenicity of animal and vegetable protein: influence of the lysine to arginina ratio. **Atherosclerosis** 1982; 41: 429-431.

Kurowska EM, Carroll KK. Essential amino acid in relation to hypercholesterolemia induced in rabbits by dietary casein**.** **J Nutr** 1990 120: 831-836.

Kuyvenhoven M, West CE, Van der Meer R., Beynen AC. Fecal steroid excretion in relation to the development of casein-induced hypercholesterolemia in rabbits. **J Nutr** 1986; 116: 1395-1404.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 1970; 227:680-685.

Lehmann JW. Case history of grain amaranth as an alternative crop. **Cereal Foods World** 1996; 41(5): 399-410.

Leon-Camacho M, Garcia-Gonzalez DL, Aparicio R. A detailed and comprehensive study of amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) oil fatty profile. **Eur Food Res Technol** 2001**;** 213:349-355.

Lin Y, Mejer GW, Vermeer MA, Tratwein EA. Soy protein enhaces the cholesterol-lowering effect of plant sterol esters in cholesterol-fed hamsters. **J Nutr** 2004; 134: 143-148.

Lindeboon N. **Studies on the characterization, biosynthesis and isolation of starch and protein from quinoa** (Chenopodium quinoa Willd.). Saskatoon (Canada); 2005[PhD Thesis – University of Saskatchewan].

Lovati MR, Manzoni C, Corsini A, Granata A, Frattini R, Fumagalli R, Sirtori CR. Low denstiy lipoprotein receptor activity is modulated by soybean globulins in cell culture. **J Nutr** 1992; 122: 1971-1978.

Lovati MR, Manzoni C, Corsini A, Granata A, Frattini R, Fumagalli R, Sirtori CR. 7S Globulin from soybean is metabolized in human cell cultures by a specific uptake and degradation system**. J Nutr** 1996; 126: 2831-2842.

Lowry OH, Resebrough NJ, Randal AJ. Protein measurement with folin phenol reagent**. J Biol Chem** 1951; 193: 265-275.

Lucas EA, Khalil DA, Daggy BP. Arjmandi, B.H. Ethanol-extracted soy protein isolate does not modulate serum cholesterol in golden syrian hamsters: a model of postmenopausal hypercholesterolemia**. J Nutr** 2001; 131: 211-214.

Luquez NG de, Fernandez S, Mucciarelli SL de. Concentrado protéico de Amaranthus cruentus. Methods de extraccion. Propriedades funcionales. **Arch Latinoam Nutr** 1996; 46(2): 143-145.

Lusas EW, Riaz MB. Soy protein: processing and use**. J Nutr** 1995; 125: 573S-580S..

Madani S, Prost J, Belleville J. Dietary protein level and origin (casein and highly purified soybean protein) affect hepatic storage, plasma lipid transport, and antioxidative defense status in the rat. **Nutrition** 2000 16: 368-375.

Magalhães MEC, Brandão AA, Freitas EV, Pozzan R, Brandão AP. Novas perspectivas no tratamento de dislipidemias. **Rev da SOCERJ** 2004; 105-111.

Mahan IK, Escott-Stump S. **Krause: Alimentos e dietoterapia**. 9ª ed. São Paulo: Roca, 1998.

Mansur AP, Favarato D, Souza MFM, Avakian SD, Aldrighi JM, César LAM, Ramires JAF. Tendência do risco de morte por doenças circulatórias no Brasil de 1979 a 1996. **Arq Bras Cardiol** 2001; 76(6):497-503.

Marcilio R, Amaya-Farfan J, Ciacco CF, Spehar RC. Fracionamento do grão de amaranto (A. cruentus) brasileiro e suas características composicionais**. Cien Tecnol Alim** 2003; 23(3):511-516.

Marmer WN, Maxwell RJ. Dry column method for the quantitative extraction and simultaneous class separation of lipids from muscle tissue. **Lipids** 1981; 5:365-371.

Marcone MF. Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: a current understanding with emphasis on 11S seed globulins. **Food Res Int** 1999; 32:79-92.

Martinez EN, Anon MC. Composition and characterization of amaranth protein isolates. An eletrophoretic and calorimetric study. **J Agric Food Chem** 1996 44:2523-2530.

Matuz J, Poka R, Boldizsar I, Szerdahelyi E, Hajos G. Structure and potential allergenic character of cereal proteins. II Potential allergens in cereal samples. **Cereal Research Communications** 2000; 28:433-442.

Miettinen TA, Vanhanen H. Serum concentration and metabolism of cholesterol during rapeseed oil and squalene feeding**. Am J Clin Nutr** 1994; 59:356-363.

Ministério da Saúde**. Dislipidemias em pacientes de alto risco de desenvolver eventos cardiovasculares**. [homepage] Disponível em <URL: http://portalweb02.saude .gov.br/portal/aplicacoes/busca/buscar.cfm?inicio=6 > [2005 out]

Monteros CJ, Nieto CC, Caicedo CV, Rivera MM, Vimos CN. Iniap alegria primera variedad mejorada de amaranto para la sierra ecuatoriana. In: **Produccion y procesamiento de quinua em ecuador**. 1998 Disponível em < URL: http:// www.idrc.ca> [2003 nov].

Moreda W, Perez-Camino MC, Cert A. Gas and liquid chromatography of hydrocarbons in edible vegetable oils. **J Chrom A** 2001; 936:159-171.

Mosse J. Nitrogen to protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seed protein content**. J Agric Food Chem** 1990; 38:18-24.

Moundras C, Behr SR, Remesy C, Demigne C. Fecal losses of sterols and bile acids induced by feeding rats guar gum are due to greater pool size and liver bile acid secretion. **J Nutr** 1995; 127:1068–76.

Moure A, Sineiro J, Dominguez H. Extraction and functionality of membrane concentrated protein from defatted *Rosa rubiginosa* seeds. **Food Chem** 2001; 74: 327-339.

Nagata Y, Ishiwaki N, Sugano M. Studies on the mecanism of anti-hypercholesterolemic action of soy protein and soy protein-type amino acid mixtures in relation to the casein counterparts in rats. **J Nutr** 1982; 112: 1614.

Nagaoka S, Miwa K, Eto M., Kuzuya Y, Hori G, Yamamoto K. Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absortion in rats and caco-2 cells. **J Nutr** 1999; 129: 1725-1730.

Nakamura R. Allergens in cereals. **Chem Biol** 1987; 25:739-741.

National Cholesterol Education Program (NCEP). **Eating to lower your high blood cholesterol.** 1987 HHS Publ. No. (NIH) 87-2920.

National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol

in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. ***Circulation***. 2002; 106: 3143–3421.

National Research Council (NRC). Nutrient requirements of hamsters In: **Nutrient Requirements of Laboratory Animals** 1995; 4 [a] ed. Washington, DC: National Academy Press; p.125-139

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. **Applied linear statistical models.** 4ed. Boston: MacGraw Hill 1408p, 1996.

Nistor A, Bulla A, Filip DA, Radu A. The hyperlipidemic hamster as a model of experimental atherosclerosis. **Atherosclerosis** 1987; 68: 159-173.

Nicolosi RJ. Dietary fat saturation effects on low-density-lipoprotein concentrations and metabolism in various animal models. **Am J Clin Nutr** 1997; 65: 1617S-1627S.

Nicolosi RJ, Wilson TA, Lawton C, Rogers EJ, Wiseman SA, Tijburg LBM, Kritchevsky D. The greater atherogenicity of nonpurified diets versus semipurified diets in hamsters is mediated via differences in plasma lipoprotein cholesterol distribution differences in plasma lipoprotein cholesterol distribuition LDL oxidative susceptibility, and plasma α-tocopherol concentration. **J Nutr Biochem** 1998; 9(10): 591-596.

Okita T, Sugano M. Effects of dietary soybean globulins on plasma and liver lipids and on fecal excretion of neutral sterols in rats. **J Nutr Sci Vitaminology** 1981; 27:379-388.

Olfert E., Cross BM, Mcwilliam AA. **Guide to the Care and Use of Experimental Animals**. 1993; Vol 1. 2 ed. Canadian Council.

Osborne TB. **The vegetable proteins**. 2nd ed. New York: Longmans and Green, 1924.

Paredes-Lopez O, Mora-Escobedo R, Ordorica-Falomic C. Isolation of amaranth protein. **Lebensm Wiss U-Technol** 1988; 21: 59-61.

Pfeuffer M. Differences in the underlying mechanisms of cholesterol and casein induced hypercholesterolemia in rabbit and rat. **Atherosclerosis** 1989; 76: 89-91.

Plate AYA; Arêas JAG. Cholesterol-lowering effect of extruded amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) in hypercholeterolemic rabbits. **Food Chem** 2002; 76:1-6.

Potter SM. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy**. J Nutr** 1995; 125:606S-611S.

Prosky L, Asp NG, Schweizer TF, de Vries JW, Furda I. Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and food products: Interlaboratory study. **J Assoc Off Anal Chem** 1988; 71: 1017-1023.

Quintão E, Nakandakare ER. **Manual de referência em dislipidemias**. Novartis, 1996.

Qureshi AA, Burger WC, Peterson DM, Elson CE. The structure of and inhibitor of cholesterol biosynthesis isolated from barley. **J Biol Sci** 1986; 261: 10544-10550.

Qureshi AA, Lehmann JW, Peterson DM. Amaranth and its oil inhibit cholesterol biosynthesis in 6-week-old female chickens. **J Nutr** 1996; 126: 1972-1978.

Raphael ML. 1997. **Recovery and kinetics study of isoelectric precipitation of sunflower protein in a tubular precipitator.** Saskatoon, Canada; 1997. [PhD thesis - University of Saskatchewan]

Ratnayake WMN, Sawar G, Laffey P. Influence of dietary protein and fat on serum lipids and metabolism of essential fatty acids in rats. **British J Nutr** 1997; 78:459-467.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition Ad Hoc riting committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr** 1993; 123: 1939-1951.

Robins SJ, Fasulo JM, Patton GM, Schaefer EJ, Smith DE, Ordovas JM. Gender differences in the development of hyperlipemia and atherosclerosis in hybrid hamsters. **Metabolism** 1995; 44(10): 1326-1331.

Robison RG. (1992**) Amaranth, quinoa, ragi, tef, and niger: tiny seeds of ancient history and modern interest in: alternative agricultural opportunities** Minnesota, EUA. 1998 Disponível em < URL: http://www.ibiblio.org/pub/academic/agriculture/sustainable_agriculture/general/grain.crops.new > [2003 nov].

Ruiz-Gutierrez V, Moreno R., Copado MA, Rodríguez-Burgos A. Detection of squalene in alpha-fetoprotein and fetal serum albumin from bovine. **J Protein Chem** 2001; 20(1): 19-23.

Salcedo-Chavez B, Osuna-Castro JA, Guevara-Lara F, Dominguez-Dominguez J, Paredes-Lopez O. Optimization of the isolates precipitation method to obtain protein isolates from amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds. **J Agric Food Chem** 2002; 50: 6515-6520.

Salo-Vaananen PP, Koivistoinen PE. Determination of foods: comparison of net protein and crude protein (Nx6.25) values**. Food Chem** 1996; 57(1): 27-31

Sanchez A, Rubano DA, Shaulik GW, Hubband R, Horning MC. Cholesterolemic effects of the lysine/arginine ration in rabbits after initial early growth. **Arch Latinoam Nutr** 1988; 28: 229-238.

Spackman DC, Stein WH, Moore S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids**. Analytical Biochemistry** 1958; v.30, p.1190-1206.

Sarwar G, L'Abbe MR, Trick K, Botting HG, Ma CY. Influence of feeding alkaline/heat processed proteins on growth and protein and mineral status of rats. **Adv Exp Med Biol**. 1999;459:161-177.

Sarwar G, Ratnayake WMN. Effects of amino acid supplementation of dietary protein on serum cholesterol and fatty acids in rats. **Nutr Research** 2000; 20(5): 665-674.

Sathe SK, Hamaker BR, Sze-Tao KWC, Venkatachalam M. Isolation, purification, and biochemical characterization of a novel water soluble protein from Inca peanut (*Plukenetia volubilis* L.). **J Agric Food Chem.** 2002; 50: 4896-4906.

Scilingo AA, Ortiz SEMO, Martinez EN, Anon MC. Amaranth protein isolates modified by hydrolitic and thermal treatments. Relationship between structure and solubility. **Food Res Int** 2002; 35: 855-862.

Shrestha MK, Peri I, Smirnoff P, Birk Y, Golan-Goldhirsh A. 2002. Jojoba seed meal proteins associated with proteolytic and protease inhibitory activities. **J Agric Food Chem** 2002; 50: 5670-5675.

Silva FAS, Azevedo CAV. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais** 2002; 4(1): 71-78.

Singhal RS, Kulkami PR. Review: amaranths-an underutilized resource. **Int J Food Sci Tech** 1988, 23:125-139.

Soloni FG. Simplified manual micro-method for determination of serum triglycerides. **Clin Chem** 1971; 17: 527-534.

Smith TJ. Squalene: potential chemopreventive agent**. Expert Opin Invest Drugs** 2000; 9:1841-1848.

Smith D, Espino-Montoro A, Perez-Jimenez F, Pedro-Botet J, Jimenez-Perez J, Ordovas, JM. Effect of a high saturated fat and cholesterol diet supplemented with squalene or β-sitosterol on lipoprotein profile in F1B hamsters. **Nutr Res** 2000, 20:1309.

Sosulski FW, Imafidon GI. Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for animal and plant foods. **J Agric Food Che**m 1990; 38:1351-1356.

Soy Protein Council. **Soy protein products: characteristics, nutritional aspects and utilization.** 1987 Washington: Soy Protein Council.

Spady DK, Dietschy JM. Interaction of dietary cholesterol and triglycerides in the regulation of hepatic low density lipoprotein transport in the hamster**. J Clin Investigation** 1988; 81:300-309.

Spehar CR, Santos RLB, Jacobsen SE. Andean grain crop introduction to the Brazilian Savannah. In: Proceedings of the **International conference on sustainable agriculture on tropical and subtropical highlands with special reference to Latin America**. Rio de Janeiro, RJ: Embrapa-Solos/INT/UFRJ/Karlsruhe Universitat, 1998.

Spehar CR, Teixeira DL, Cabezas WARL, Erasmo EAL. Amaranto BRS Alegria: alternativa para diversificar os sistemas de produção. **Pesq Agropec Bras**. 2003; 38(5): 659-663.

Spies JR. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry** 1967, v.39, 9. 1412-1415.

Sugano M, Ishiwaki N, Nagata Y, Imaizumi K. Effects of arginine and lysine addition to casein and soya-bean protein on serum lipids apolipoproteins, insulin and glucagon in rats. **Br J Nutr** 1982; 48:211-221.

Sugano M, Ishiwaki N, Nakashime K. Dietary protein-dependent modification of serum cholesterol level in rats. Significance of the lysine./arginine ratio. **Ann Nutr Metabolism** 1984; 28:192-199.

Sugano M, Goto S, Yamada Y, Yoshida K, Hashimoto U, Matsuo T, Kimoto M. Cholesterol-lowering activity of various undigested fractions of soybean in rats. **J Nutr** 1990; 120: 977-985.

Stipanuk M. **Bioquimical and physiological aspects of human nutrition**. Philadelphia: W.B. Saunders; 2000.

Sikorski Z. **Chemical and functional properties of food proteins**. CRC Press; 2001.

Strandberg TE, Tilvis RS, Miettinen TA. Metabolic variables of cholesterol during squalene feeding in humans: comparison with cholestyramine treatment. **J Lipid Res** 1990; 31:1637.

Tasker TE, Porter SM. Effects of dietary protein source on plasma lipids, HMG-CoA reductase activity, and hepatic glutathione levels in gerbils. **J Nutr Biochem** 1993; 4: 458.

Tauchuck R. Nitrogen to protein conversion factors for cereals and oilseed meals. **Cereal Chem** 1969; 46(4): 419.

Terpstra AHM, West, CE, Fennis JTCM, Schouten, JA, Van der Veen, EA Hypocolesterolemic effect of dietary soy protein versus casein in rhesus monkeys (Macaca mulata). **Am J Clin Med**, 1984; 39: 1-7.

Terpstra AHM, Holmes JC, Nicolosi RJ. The hypercholesterolemic effect of dietary soybean protein vs. casein in hamsters fed cholesterol–free or cholesterol-enriched semipurified diets. **J Nutr** 1991; 121:944-947.

Terpstra AHM, Lapre JA , Vries HT de, Beynen AC. Dietary pectin with high viscosity lowers plasma cholesteryl éster transfer protein activity in hamsters**. J Nutr** 1998; 128(11): 1944-1949.

Teutonico RA, Knorr D. Amaranth: composition, properties and applications of a rediscovered food crop. **Food Technol** 1985; 39: 49-60.

Trautwein EA, Liang J, Hayes KC. Plasma lipoproteins, biliary lipids and bile acid profile differ in various strains of Syrian hamsters *Mesocricetus auratus*. **Comp Biochem Physiol** 1993a; 104A(4): 829-835.

Trautwein EA, Siddiqui A, Hayes KC. Modeling plasma lipoprotein-bile lipid relationships: differential impact of psyllium and cholestyramine in hamsters fed a lithogenic diet. **Metabolism.** 1993b; 42(12): 1531-1540.

Turley SD, Daggy BP, Dietschy JM. Cholesterol-lowering action of psyllium mucilloid in the hamster: sites and possible mechanisms of action. **Metabolism** 1991;40:1063–73.

Turley SD, Daggy BP, Dietschy JM. Effect of feeding psyllium and cholestyramine in combination on low density lipoprotein metabolism and fecal bile acid excretion in hamsters with dietary-induced hypercholesterolemia. **J Cardiovasc Pharmacol**. 1996; 27 :71-79.

Turley SD, Herndon MW, Dietschy JM. Reevaluation and application of the dual-isotope plasma ratio method for the measurement of intestinal cholesterol absorption in the hamster. **J Lipid Res**. 1994; 35:328-339.

Tzeng YM, Diosady LL, Rubin LJ. 1988. Preparation of rapeseed protein isolates using ultrafiltration, precipitation and diafiltration. **Can Inst Food Sci Technol J** 1988; 21: 419-424.

Tzeng YM, Diosady LL, Rubin LJ. Production of canola protein materials by alkaline extraction, precipitation, and membrane processing. **J Food Sci** 1990; 4: 1147-1152.

US Department of Agriculture. **USDA Nutrient Database for Standard Reference – Release 16** 2004. Disponível em < URL: http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp > [2005 nov].

Uzzan A. Vegetable protein products from seeds: technology and uses in food industry. In: **Development in Food Proteins**. Hudson BJF (Ed.) 1988; New York:Elsevier Applied Science. p.73-118.

Vahouny GV, Adamson I, Chalcarz W, Satchithanandam S, Muesing R, Klurfeld DM, Tepper,AS, Sanghvi A, Kritchevsky D. Effects of casein and soy protein on hepatic and serum lipids and lipoprotein lipid distributions in rat. **Atherosclerosis** 1985; 56: 127-137, 1985.

Vahouny GV, Tombes R, Cassidy MM, Kritchevsky D, Gallo LL. Dietary fibers. V. Binding of bile salts, phospholipids and cholesterol from mixed micelles by bile acid sequestrants and dietary fibers. **Lipids** 1980;15:1012–8.

Van Der Meer, R., Vries, H De, Glatz, JFC. t-Butanol Extraction of feces: rapid procedure for enzymic determination of fecal bile acids. In: **Cholesterol metabolism in health and disease studies in the netherlands**. Wageningen: Posen and Looijen. 1985; p.113-119.

Vojdani J. Solubility In: **Methods of testing protein functionality**; Hall, G. M. Ed. Glasgow, Scotland; Blackie Academic and Professional:. 1992; p. 11-60.

Xu L, Lui F, Luo H, Diosady, LL. Production of protein isolates from yellow mustard meals by membrane processes. **Food Res Int** 2003; 36: 849-856.

Zheleznov AV, Solonenko LP, Zheleznova NB. Seed proteins of the wild and the cultivated Amaranthus species. **Euphytica** 1997; 97:177-182.

Yanez e, Zacarias I, Granger D, Vasquez M, Estevez AM. Caracterizacion química y nutricional del amaranto (Amaranthus cruentus). **Arch Latinoam Nutr** 1994; 44(1): 57-62.

Yeh SL, Hsu CY, Shiem MJ. Effect of dietary casein and soy protein on plasma lipids in a streptozotocin-induced diabetes model jn hamsters **Nutr Res** 1998; 18 (10): 1757-1768.

Warnick GR *et al*. National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of high-density lipoprotein cholesterol: executive summary. **Clin Chem** 1995; 41(10): 1427-1433.

Weingard KW, Daggy BP. Quantification of high-desnsity-lipoprotein cholesterol in plasma from hamsters by differential precipitation. **Clin Chem** 1990; 36: 575.

West CE, Beynen AC, Scholz KE, Terpstra AHM., Schuttle JB, Deuring K, Van Gils LGM. Treatment of dietary casein with formaldehyde reduces its hypocholesterolemic effect in rabbits. **J Nutr** 1984; 114:17-25.

Wilhelm E, Aberle T, Burchard W, Landers R. Peculiarities of aqueous amaranth starch suspensions **Biomacromolecules** 2002; 3 (1): 17-26.

Witzum JL, Steimberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. **J Clin Invest** 1991; 88: 1785-1792.

Wright SM, Salter AM. Effects of soyprotein on plasma cholesterol and bile acid excretion in hamsters. **Comp Biochem Physiol** 1998; 119b(2): 247-254.

ANEXOS

ANEXO 1– Parecer do comitê de ética em pesquisa

HC

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27.10.04, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **871/04**, intitulado: **"Efeito Hipocolesterolemizante da Proteína de Amaranto (*Amaranthus cruentus* BRS - Alegria) em Hamsters (*Mesocricetus auratus*)"** apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: **Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva**
Pesquisador(a) Executante: **Sra. Simone Mendonça**

CAPPesq, 27 de Outubro de 2004.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq@hcnet.usp.br

ANEXO 2 - P-valores dos testes para comparar as médias dos níveis plasmáticos do experimento Principal após as dietas.

Dieta	Variáveis Plasmáticas	p-valor
Basal, Hipercolesterolemizante e 1ª Semanas de Dieta Experimental	Colesterol Total	< 0,001
	Triglicérides	0,022
	HDL-C	<0,001
	Não-HDL-C	<0,001
Basal, Hipercolesterolemizante e 4ª Semana de Dieta Experimental	Colesterol Total	<0,001
	Triglicérides	<0,001
	HDL-C	<0,001
	Não-HDL-C	<0,001

ANEXO 3 – Intervalo de confiança (90%) e p-valores das comparações múltiplas de Bonferroni para a diferença de médias (linha-coluna) dos níveis plasmáticos do experimento Principal na coleta basal, após a dieta Hipercolesterolemizante e após **uma semana** de consumo de cada dieta experimental.

Variável	Dieta	Basal	Hiper	Controle	AM+CAS
Colesterol Total	Hiper	**[40,34; 80;48] p< 0,001**			
	Controle	**[73,88; 124,40] p< 0,001**	**[17,47; 60,00] p< 0,001**		
	AM+CAS	[-16,97; 39,94] p>0,999	**[-73,90; -23,95] p< 0,001**	**[-116,96; -58,35] p< 0,001**	
	Amaranto	[-36,62; 20,29] p>0,999	**[-93,55; -43,60] p< 0,001**	**[-136,61; -78,00] P< 0,001**	[-51,75; 12,45] p>0,999
Triglicérides	Hiper	[33,63; 39,18] p>0,999			
	Controle	[-49,77; 41,85] p>0,999	[-31,83; 45,29] p>0,999		
	AM+CAS	[-80,13; 23,09] p>0,999	[-76,59; 14,01] p>0,999	[-77,71; 28,59] p>0,999	
	Amaranto	[-103,00; 0,22] p>0,999	**[-99,43; -8,87] p< 0,001**	[-100,58; 5,72] P=0,203	[-81,10; 35,35] p>0,999
HDL-C	Hiper	**[16,55; 40,39] p< 0,001**			
	Controle	**[32,47; 62,47] p< 0,001**	**[6,37; 31,62] p=0,002**		
	AM+CAS	[-7,07; 26,72] p>0,999	**[-33,48; -3,82] p=0,016**	**[-55,04; -20,24] p< 0,001**	
	Amaranto	[-11,95; 21,85] p>0,999	**[-38,35; -8,69] p=0,001**	**[-59,92; -25,11] P< 0,001**	[-23,94; 14,19] p>0,999
Não-HDL-c	Hiper	**[13,12; 50,75] p< 0,001**			
	Controle	**[28,00; 75,35] p< 0,001**	[-0,19; 39,66] p=0,107		
	AM+CAS	[-25,01; 28,33] p>0,999	**[-53,69; -6,87] p=0,012**	**[-77,48; -22,55] p< 0,001**	
	Amaranto	[-39,79; 13,55] p>0,999	**[-68,46; -21,65] p<0,001**	**[-92,26; -37,32] P< 0,001**	[-44,86; 15,31] p>0,999

ANEXO 4 – Intervalo de confiança (90%) e p-valores das comparações múltiplas de Bonferroni para a diferença de médias (linha-coluna) dos níveis plasmáticos do experimento Principal na coleta basal, após a dieta Hipercolesterolemizante e após **quatro semanas** de consumo de cada dieta experimental.

Variável	Dieta	Basal	Hiper	Controle	AM+CAS
Colesterol Total	Hiper	**[35,76; 57,36] p< 0,001**			
	Controle	**[40,96;62,09] p< 0,001**	[-4,89; 14,81] p>0,999		
	AM+CAS	**[13,89;36,07] p=0,004**	**[-31,99; -11,16] p=0,009**	**[-36,70; -16,37] p=0,001**	
	Amaranto	[-14,68; 7,50] p>0,999	**[-60,56; -39,74] P< 0,001**	**[-65,28; -44,94] p< 0,001**	**[-39,29;-17,86] P< 0,001**
Triglicérides	Hiper	[-19,11; 45,00] p>0,999			
	Controle	[-31,51; 31,18] p>0,999	[-42,33; 16,12] p>0,999		
	AM+CAS	[-54,50; 11,34] p=0,833	**[-65,43; -3,62] p=0,044**	[-51,59; 8,75] p=0,616	
	Amaranto	**[-77,74; -11,90] p=0,007**	**[-88,67; -26,86] P< 0,001**	**[-74,83; -14,48] p=0,003**	[-55,04; 8,57] P=0,547
HDL-C	Hiper	**[15,14; 33,82] p< 0,001**			
	Controle	**[17,91; 36,17] p< 0,001**	[-5,95; 11,08] p>0,999		
	AM+CAS	**[13,52; 37,70] p< 0,001**	[-10,37; 7,64] p>0,999	[-12,72; 4,86] p>0,999	
	Amaranto	[-4,30; 14,88] p>0,999	**[-28,19; -10,19] p<0,001**	**[-30,54; -12,96] p< 0,001**	**[-27,09; -8,56] P< 0,001**
Não-HDL-c	Hiper	**[7,85; 36,31] p=0,002**			
	Controle	**[10,56; 38,39] p< 0,001**	[-10,57; 15,37] p>0,999		
	AM+CAS	[-12,74; 16,48] p>0,999	**[-33,93; -6,49] p=0,003**	**[-36,00; -9,22] p=0,001**	
	Amaranto	[-23,49; 5,73] p>0,999	**[-44,68; -17,24] p<0,001**	**[-46,75; -19,97] p< 0,001**	[-24,86; 3,36] p>0,999

ANEXO 5 – P-valores dos testes para comparar as médias dos níveis plasmáticos do experimento Principal após uma semana e quatro semanas de consumo de cada dieta experimental e intervalos de confiança (90%) de Bonferroni para a diferença das médias (4ªsemana – 1ªsemana).

Variáveis Plasmáticas	Dieta	p-valor	Intervalo de Confiança
Colesterol Total	Controle	**0,016**	**[-58,00; -17,76]**
	Amaranto	0,574	[-20,21; 32,14]
	AM+CAS	**0,035**	**[2,07; 7,33]**
Triglicérides	Controle	0,422	[-12,91; 31,55]
	Amaranto	0,134	[-3,04; 34,91]
	AM+CAS	0,161	[-2,11; 14,58]
HDL-C	Controle	**0,041**	**[-33,94; -5,54]**
	Amaranto	0,917	[-26,75; 24,68]
	AM+CAS	**0,072**	**[2,38; 25,16]**
Não HDL-C	Controle	0,166	[-40,97; 4,69]
	Amaranto	**0,066**	**[1,45; 12,55]**
	AM+CAS	0,188	[-22,52; 4,38]

ANEXO 6 – Intervalos de confiança (90%) e p-valores das comparações múltiplas de Bonferroni para a diferença de médias (linha-coluna) das digestibilidades das dietas consumidas no experimento Principal.

Dieta	Hiper	Controle	AM+CAS
Controle	**[0,28;4,67]** **p=0.043**		
AM+CAS	[-1,96;3,20] p>0,999	[-4,22;0,51] p=0,352	
Amaranto	[-0,73;4,19] p=0,537	[-2,98;1,48] p>0,999	[-1,51;3,72] p>0,999

ANEXO 7 - Correlação de Pearson e significância entre as variáveis plasmáticas, peso e consumo dos machos após dieta Hipercolesterolemizante.

	CT	TG	HDL-C	não-HDL	Peso
TG	-0,197 (0,420)				
HDL-C	0,562 (0,012)	0,016 (0,949)			
não-HDL	**0,932** (0,000)	-0,238 (0,326)	0,225 (0,354)		
Peso	-0,069 (0,778)	-0,005 (0,983)	-0,042 (0,866)	-0,063 (0,797)	
Consumo	0,259 (0,284)	-0,037 (0,882)	0,305 (0,204)	0,172 (0,481)	**0,814** (0,000)

Valores entre parênteses representam os valores-p.

ANEXO 8 - Correlação de Pearson e significância entre as variáveis plasmáticas, peso e consumo dos machos após dieta Controle.

	CT	TG	HDL-C	não-HDL	Peso
TG	-0,320 (0,367)				
HDL-C	**0,931** (0,000)	-0,523 (0,121)			
não-HDL	**0,901** (0,000)	-0,022 (0,953)	**0,680** (0,030)		
Peso	-0,496 (0,145)	0,433 (0,211)	-0,744 (0,014)	-0,111 (0,759)	
Consumo	-0,303 (0,394)	0,702 (0,024)	-0,596 (0,069)	0,098 (0,787)	**0,800** (0,005)

Valores entre parênteses representam os valores-p.

ANEXO 9 - Correlação de Pearson e significância entre as variáveis plasmáticas, peso e consumo dos machos após dieta Amaranto+Caseína.

	CT	TG	HDL-C	não-HDL	Peso
TG	0,153 (0,718)				
HDL-C	0,590 (0,123)	**0,727** (0,041)			
não-HDL	**0,863** (0,006)	-0,267 (0,523)	0,102 (0,811)		
Peso	0,181 (0,668)	-0,440 (0,276)	-0,443 (0,271)	0,501 (0,206)	
Consumo	0,026 (0,952)	-0,345 (0,402)	-0,379 (0,354)	0,269 (0,519)	**0,886** (0,003)

Valores entre parênteses representam os valores-p.

ANEXO 10 - Correlação de Pearson e significância entre as variáveis plasmáticas, peso e consumo dos machos após dieta Amaranto.

	CT	TG	HDL-C	não-HDL	Peso
TG	0,571 (0,139)				
HDL-C	**0,694** (0,056)	-0,012 (0,977)			
não-HDL	**0,759** (0,029)	**0,803** (0,016)	0,059 (0,890)		
Peso	-0,581 (0,131)	-0,013 (0,975)	-0,394 (0,334)	-0,447 (0,267)	
Consumo	-0,569 (0,141)	0,010 (0,981)	-0,481 (0,228)	-0,351 (0,394)	**0,945** (0,000)

Valores entre parênteses representam os valores-p.

ANEXO 11 – P-valores dos testes para comparar as médias dos níveis plasmáticos do experimento Aminoácidos após as dietas.

Dieta	Variáveis Plasmáticas	p-valor
Basal, Hipercolesterolemizante e 1ª Semanas de Dieta Experimental	Colesterol Total	< 0,001
	Triglicérides	0,044
	HDL-C	0,002
	Não-HDL-C	<0,017
Basal, Hipercolesterolemizante e 4ª Semana de Dieta Experimental	Colesterol Total	0,005
	Triglicérides	0,032
	HDL-C	<0,001
	Não-HDL-C	0,120

ANEXO 12 – Intervalo de confiança (90%) e p-valores das comparações múltiplas de Bonferroni para a diferença de médias (linha-coluna) dos níveis plasmáticos do experimento Aminoácido na coleta basal, após a dieta Hipercolesterolemizante e após **uma semana** de consumo de cada dieta experimental.

	Dieta	Basal	Hiper	Controle	CAS+ARG	AA CAS
Colesterol Total	Hiper	**[18,26; 80;94]** **p = 0,001**				
	Controle	**[17,72; 91,48]** **p = 0,003**	[-28,67; 38,67] p > 0,999			
	CAS+Arg	**[20,72; 94,48]** **p = 0,002**	[-25,67; 41,67] p > 0,999	[-35,88; 41,88] p > 0,999		
	AA CAS	**[27,22;100,98]** **p < 0,001**	[-19,17; 48,17] p > 0,999	[-29,38; 48,38] p > 0,999	[-32,38;45,38] p > 0,999	
	AA AM	**[2,47; 76,23]** **p = 0,062**	[-43,92; 23,42] p > 0,999	[-54,13; 23,63] P > 0,999	[-57,13;20,63] p > 0,999	[-63,63;14,13] p>0,999
Triglicérides	Hiper	[-81,57; 116;22] p > 0,999				
	Controle	[-107,17;125,57] p > 0,999	[-114,36; 98,11] p > 0,999			
	CAS+Arg	[-1,67; 231,07] p = 0,111	[-8,86; 203,61] p =0,178	[-17,17; 228,17] p = 0,206		
	AA CAS	[-62,42; 170,33] p > 0,999	[-69,61; 142,86] p > 0,999	[-77,92; 167,42] p > 0,999	[-183,42; 61,92] p > 0,999	
	AA AM	[-33,92; 198,82] p = 0,685	[-41,11; 171,36] p > 0,999	[-49,42; 195,92] P > 0,999	[-154,92; 90,42] p > 0,999	[-94,17; 151,17] p>0,999
HDL-C	Hiper	**[6,50; 46;90]** **p = 0,001**				
	Controle	**[8,68; 56,22]** **p = 0,007**	[-15,94; 27,44] p > 0,999			
	CAS+Arg	**[9,93; 57,47]** **p = 0,005**	[-14,70; 28,70] p > 0,999	[-23,80; 26,30] p > 0,999		
	AA CAS	**[4,93; 52,47]** **p = 0,023**	[-19,70; 23,70] p > 0,999	[-28,80; 21,30] p > 0,999	[-30,05; 20,05] p > 0,999	
	AA AM	[-3,07; 44,47] p = 0,242	[-27,70; 15,70] p > 0,999	[-36,80; 13,30] P > 0,999	[-38,05; 12,05] p > 0,999	[-33,05; 17,05] p>0,999
Não-HDL-c	Hiper	[-2,02; 42;57] p = 0,0187				
	Controle	[-4,09; 48,39] p = 0,289	[-22,07; 25,82] p > 0,999			
	CAS+Arg	[-2,34; 50,14] p = 0,185	[-20,32; 27,57] p > 0,999	[-25,90; 29,40] p > 0,999		
	AA CAS	**9,16;61,64]** **p = 0,008**	[-8,82; 39,07] p > 0,999	[-14,40; 40,90] p > 0,999	[-16,15; 39,15] p > 0,999	
	AA AM	[-7,59; 44,89] p = 0,676	[-25,57; 22,32] p > 0,999	[-31,15; 24,15] P > 0,999	[-32,90; 22,40] p > 0,999	[-44,40;10,90] p>0,999

ANEXO 13 – Intervalo de confiança (90%) e p-valores das comparações múltiplas de Bonferroni para a diferença de médias (linha-coluna) dos níveis plasmáticos do experimento Aminoacido na coleta basal, após a dieta Hipercolesterolemizante e após **quatro semanas** de consumo de cada dieta experimental.

	Dieta	Basal	Hiper	Controle	CAS+ARG	AA CAS
Colesterol Total	Hiper	**[8,63; 90;57] p = 0,022**				
	Controle	**[10,14; 106,56] p = 0,022**	[-35,26; 52,76] p > 0,999			
	CAS+Arg	**[14,80; 98,97] p = 0,008**	[-29,91; 44,48] p > 0,999	[-46,51; 43,58] p > 0,999		
	AA CAS	**[4,11;109,09] p = 0,057**	[-41,66; 55,66] p > 0,999	[-56,64; 53,14] p > 0,999	[-49,88; 49,31] p > 0,999	
	AA AM	[-25,89; 79,09] p > 0,999	[-71,66; 25,66] p > 0,999	[-86,64; 23,14] p > 0,999	[-79,88; 19,31] p > 0,999	[-88,68; 28,68] p>0,999
Triglicérides	Hiper	[-84,07; 118,72] p > 0,999				
	Controle	[-136,11;102,51] p > 0,999	[-143,04; 74,79] p > 0,999			
	CAS+Arg	[-26,37; 181,92] p = 0,544	[-31,61; 152,5] p =0,944	[-16,91; 206,05] p = 0,282		
	AA CAS	[-167,36; 92,43] p > 0,999	[-175,21; 65,62] p > 0,999	[-156,51;115,18] p > 0,999	[-237,98; 7,50] p = 0,153	
	AA AM	[-179,69; 80,09] p = 0,685	[-187,54; 53,29] p > 0,999	[-168,85;102,85] p > 0,999	**[-250,31;-4,83] p =0,076**	[-157,56; 132,89] p>0,999
HDL-C	Hiper	**[1,48; 51;92] p = 0,066**				
	Controle	**[22,77; 82,13] p < 0,001**	[-1,34; 52,84] p = 0,141			
	CAS+Arg	**[15,29; 67,10] p = 0,001**	[-8,40; 37,40] p > 0,999	[-38,98; 16,48] p > 0,999		
	AA CAS	**[15,56; 80,18] p = 0,003**	[-8,78; 51,12] p = 0,698	[-38,37; 29,21] p > 0,999	[-23,86; 37,20] p > 0,999	
	AA AM	[-6,11; 58,51] p = 0,361	[-30,45; 29,45] p > 0,999	[-60,04; 7,54] p = 0,450	[-45,53; 15,53] p > 0,999	[-57,79; 14,46] p>0,999

ANEXO 14 – P-valores dos testes para comparar as médias dos níveis plasmáticos do experimento Aminoácido após uma semana e quatro semanas de consumo de cada dieta experimental e intervalos de confiança (90%) de Bonferroni para a diferença das médias (4ªsemana – 1ªsemana).

Variáveis Plasmáticas	Dieta	p-valor	Intervalo de Confiança
Colesterol Total	Controle	0,692	[-16,46; 23,96]
	AA AM	0,476	[-20,21; 32,14]
	CAS+ARG	0,319	[2,07; 7,33]
	AA CAS	**0,057**	**[-20,76; -3,24]**
Triglicérides	Controle	0,221	[-65,67; 13,67]
	AA AM	**0,041**	**[-211,00; -51,66]**
	CAS+ARG	0,657	[-51,05; 35,72]
	AA CAS	**0,056**	**[-138,93; -22,40]**
HDL-C	Controle	0,138	[-3,40; 43,40]
	AA AM	0,471	[-13,88; 25,88]
	CAR+ARG	0,610	[-18,10; 27,43]
	AA CAS	**0,097**	**[2,39; 26,43]**
Não HDL-C	Controle	**0,020**	[-24,70; -7,80]
	AA AM	0,252	[-30,21; 8,87]
	CAS+ARG	**0,056**	**[-24,63; -4,03]**
	AA CAS	**0,005**	**[-30,48; -20,18]**

ANEXO 15 - Correlação de Pearson e significância entre as variáveis plasmáticas, peso e consumo das fêmeas após dieta Hipercolesterolemizante.

	CT	TG	HDL-C	não-HDL	Peso
TG	0,219 (0,602)				
HDL-C	**0,818** **(0,013)**	0,238 (0,571)			
Não-HDL	**0,916** **(0,001)**	0,551 (0,157)	**0,708** **(0,050)**		
Peso	0,374 (0,361)	-0,084 (0,843)	0,071 (0,867)	0,377 (0,358)	
Consumo	0,495 (0,213)	0,656 (0,077)	0,186 (0,659)	**0,773** **(0,025)**	0,493 (0,214)

ANEXO 16 - Correlação de Pearson e significância entre as variáveis plasmáticas, peso e consumo das fêmeas após dieta Controle.

	CT	TG	HDL-C	não-HDL	Peso
TG	0,540 (0,269)				
HDL-C	*0,736* *(0,095)*	0,599 (0,209)			
não-HDL	0,477 (0,339)	-0,004 (0,994)	-0,244 (0,641)		
Peso	-0,079 (0,881)	0,603 (0,205)	0,488 (0,326)	*-0,747* *(0,088)*	
Consumo	-0,021 (0,968)	0,677 (0,139)	0,320 (0,537)	-0,446 (0,376)	**0,899** **(0,015)**

ANEXO 17 - Correlação de Pearson e significância entre as variáveis plasmáticas, peso e consumo das fêmeas após dieta Caseína+Arginina.

	CT	TG	HDL-C	não-HDL	Peso
TG	**0,695 (0,083)**				
HDL-C	**0,988 (0,000)**	**0,701 (0,079)**			
não-HDL	**0,978 (0,000)**	0,659 (0,107)	**0,935 (0,002)**		
Peso	0,241 (0,603)	0,161 (0,730)	0,338 (0,458)	0,097 (0,835)	
Consumo	0,389 (0,388)	0,124 (0,791)	0,481 (0,274)	0,248 (0,592)	**0,961 (0,001)**

ANEXO 18 - Correlação de Pearson e significância entre as variáveis plasmáticas, peso e consumo das fêmeas após dieta Aminoácidos da Caseína.

	CT	TG	HDL-C	não-HDL	Peso
TG	*0,814* *(0,094)*				
HDL-C	0,691 (0,196)	0,773 (0,125)			
não-HDL	0,821 (0,089)	0,501 (0,390)	0,154 (0,804)		
Peso	-0,287 (0,639)	0,057 (0,927)	0,479 (0,414)	-0,772 (0,126)	
Consumo	-0,424 (0,476)	0,086 (0,891)	0,298 (0,626)	*-0,816* *(0,092)*	**0,893** **(0,042)**

ANEXO 19 - Correlação de Pearson e significância entre as variáveis plasmáticas, peso e consumo das fêmeas após dieta Aminoácidos do Amaranto.

	CT	TG	HDL-C	não-HDL	Peso
TG	0,138 (0,794)				
HDL-C	**0,933** **(0,007)**	0,244 (0,641)			
não-HDL	**0,968** **(0,002)**	-0,062 (0,907)	**0,869** **(0,025)**		
Peso	0,625 (0,185)	0,466 (0,352)	0,427 (0,398)	0,495 (0,318)	
Consumo	**0,969** **(0,001)**	0,251 (0,632)	**0,908** **(0,012)**	**0,945** **(0,005)**	0,604 (0,204)