UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FCF / FEA / FSP
Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Nutrição Humana Aplicada – PRONUT

LUÍLA ÍVINI ANDRADE DE CASTRO

Efeito da ingestão do óleo de amaranto
no metabolismo lipídico de hamsters

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientador:
Prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas

São Paulo
2011

LUÍLA ÍVINI ANDRADE DE CASTRO

**Efeito da ingestão do óleo de amaranto
no metabolismo lipídico de hamsters**

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas

(Orientador/Presidente)

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2011.

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

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

C355e	Castro, Luíla Ívini Andrade de Efeito da ingestão do óleo de amaranto no metabolismo lipídico de hamsters / Luíla Ívini Andrade de Castro. -- São Paulo, 2011. 119p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade da USP. Faculdade de Saúde Pública da USP. Curso Interunidades em Nutrição Humana Aplicada. Orientador: Arêas, José Alfredo Gomes 1. Alimentos funcionais : Ciência dos alimentos 2. Metabolismo lipídico 3. Nutrição experimental : Ciência dos alimentos I. T. II. Arêas, José Alfredo Gomes, orientador. 641.1 CDD
-------	--

AGRADECIMENTOS

A Deus, autor da vida e fonte de toda sabedoria, aquele que me capacita e sustenta em todos os momentos da vida. *Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele seja a glória para sempre!* (Romanos 11:36).

Ao professor Dr. José Alfredo Gomes Arêas, pela oportunidade de realizar o mestrado, pela convivência agradável e por todos os ensinamentos durante esse tempo.

Aos professores da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM): Dra. Ivy Scorzi Cazelli Pires, Dr. Christiano Vieira Pires e Dra. Tania Regina Riul, pelos ensinamentos, conselhos e apoio que antecederam o meu ingresso no mestrado.

Aos professores Dra. Emília Ishimoto, Dr. Silvio Vicente e Dra. Elizabeth Torres pelas valiosas sugestões no início do meu trabalho.

À minha família, em especial meus pais Ubirajara e Maria Castro, e meus irmãos Uiara Live e Vítor Hugo, pelo amor, confiança e incentivo em todas as etapas da minha vida.

Aos meus avós Antônio Gomes e Raimunda Andrade, pelo amor e confiança que sempre depositaram em mim.

Ao Braulio Gomes Domingues, pela amizade, incentivo e companheirismo durante todo esse tempo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa que usufruí no início mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida nos demais meses.

A todos os colegas do Laboratório de Bioquímica e Propriedades Funcionais dos Alimentos e do Laboratório de Bromatologia, pelo convívio e aprendizado.

Agradeço em especial à Técnica do Laboratório de Bioquímica e Propriedades Funcionais dos Alimentos: Rosana Aparecida Manólio Soares, pelo convívio diário, amizade, prontidão em ajudar e pelas valiosas sugestões em todos os momentos que precisei.

Às minhas grandes amigas Patrícia Beleza Antunes e Karen Pacheco, pelos vários momentos de descontração e encorajamento mútuo, que certamente tornaram esta jornada melhor.

À Lilian Carolina de Assis Vaz, pela amizade, paciência, discussões construtivas e grande aprendizado.

Às alunas de Iniciação Científica Olívia Carvalho, Marcia Salandini, Ludmila Toledo, Nara Letícia, Natália e às alunas de Mestrado Jessica Mascaretti e Thais Suraty, pelo precioso auxílio em algumas etapas do ensaio biológico.

À Karoline Frota, Gustavo Fontanari e Yara Severino, pelas dicas e sugestões na etapa do ensaio biológico.

À professora Dra. Vanessa Dias Capriles, pela amizade, momentos agradáveis e aprendizado durante esses anos.

A todos os funcionários do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública, em especial Roseli, Beth, Zé Bezerra e Bastos.

Aos funcionários do Biotério do Instituto de Medicina Tropical e Centro de Bioterismo da USP: Luiz Mundel, Andréa, Renato, Carlinhos, Vilma, Robison, Luiza, Milena, Marilda, Carlos e Dila.

Às funcionárias do Centro de Ciência e Qualidade dos Alimentos do ITAL (Campinas-SP): Roseli Aparecida Ferrari, Ana Rauen e Claudia Almeida.

Ao Adilson Manzano da Ecirtec (Bauru-SP), pelo auxílio nos primeiros testes de extração do óleo de amaranto por prensagem.

À professora Dra Maria Ângela Meireles e alunas Juliana Prado e Glaucia Helena da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp (Campinas-SP), que possibilitaram o teste de extração do óleo de amaranto por CO₂ supercrítico.

Ao professor Dr. Paulo Saldiva da Faculdade de Medicina da USP, pela contribuição na análise histológica.

Aos funcionários do PRONUT, em especial Jorge, Elaine, Mônica, Lilian, Majô e Edilson.

À Rosana, Lilian, Gustavo e Prof. Arêas, por terem dedicado parte de seu tempo à revisão cuidadosa do meu trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Feliz o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento; porque melhor é o lucro que ela dá do que o da prata, e melhor a sua renda do que o ouro mais fino. Mais preciosa é do que pérolas, e tudo o que podes desejar não é comparável a ela. O alongar-se da vida está na sua mão direita, na sua esquerda, riquezas e honra. Os seus caminhos são caminhos deliciosos, e todas as suas veredas, paz. É árvore de vida para os que a alcançam, e felizes são todos os que a retêm.

(Provérbios 3: 13-18)

RESUMO

Castro LIA. Efeito do óleo de amaranto no metabolismo lipídico de hamsters [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública/Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade/Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2011.

Introdução. O amaranto é um pseudocereal de alto valor nutritivo, além de apresentar propriedade de redução do colesterol plasmático. O conteúdo lipídico de seus grãos é superior ao dos cereais comuns, com elevado teor de ácidos graxos insaturados, além de apresentar quantidade significativa de esqualeno, um dos possíveis compostos bioativos responsáveis pela redução do colesterol. **Objetivo.** Verificar o efeito do óleo de amaranto e do esqualeno no metabolismo lipídico de hamsters alimentados com gordura saturada e colesterol. **Metodologia.** O óleo de amaranto foi extraído por solvente orgânico (n-hexano) e analisado nos seus conteúdos de esqualeno. O potencial efeito hipocolesterolemizante deste óleo foi avaliado mediante um ensaio biológico, em que foram utilizados 40 hamsters recém-desmamados. Os animais foram divididos em 4 grupos de 10, diferenciados pelas dietas: controle [dieta normal com 20% de óleo de milho] (C), hipercolesterolêmica [dieta com 12% de gordura de côco, 8% de óleo de milho e 0,1% de colesterol] (H), óleo de amaranto [idêntica à (H) com óleo de amaranto substituindo o de milho] (A) e esqualeno [idêntica à (H) + esqualeno na proporção encontrada no óleo de amaranto] (E), formuladas segundo as recomendações da NRC (1995) e AIN-93. Após 28 dias de experimento, os animais tiveram o sangue coletado por punção

cardíaca, sob anestesia, sendo determinados o colesterol total, triglicérides, HDL-c e colesterol não-HDL plasmáticos. Após sacrifício, os fígados dos animais foram coletados para a realização da análise histológica e do teor de colesterol. Também foram determinados os teores de colesterol e ácidos biliares das fezes dos animais.

Resultados. Não houve diferença estatisticamente significativa no perfil lipídico e excreção fecal de colesterol dos animais dos grupos hipercolesterolêmico, óleo de amaranto e esqualeno. A excreção fecal de ácidos biliares foi maior nos animais dos grupos óleo de amaranto e esqualeno em comparação com os grupos controle e hipercolesterolêmico. O teor de colesterol hepático dos animais do grupo esqualeno foi maior em relação aos outros grupos, embora tenha se diferenciado estatisticamente apenas do grupo controle. Em relação à análise histológica hepática, os maiores graus de esteatose e inflamação parenquimatosa foram os dos grupos óleo de amaranto e esqualeno. **Conclusões.** O óleo de amaranto e o seu componente esqualeno não apresentaram efeito hipocolesterolemizante e promoveram um aumento da excreção de ácidos biliares em hamsters alimentados com dieta contendo elevadas quantidades de gordura saturada e colesterol.

Descritores: Óleo de amaranto. Esqualeno. Metabolismo lipídico. Hamsters.

ABSTRACT

Castro LIA. Effect of amaranth oil on lipid metabolism of hamsters [MSc Dissertation]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública/Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade/Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2011.

Introduction: Amaranth is a pseudo cereal of superior nutritional value, besides its property of reducing serum cholesterol. The lipid content of the grains is higher than common cereals, with high content of unsaturated fatty acids. Amaranth also presents significant amounts of squalene, a possible bioactive compound responsible for lowering cholesterol. **Objective:** To investigate the effect of amaranth oil and squalene on lipid metabolism in hamsters fed with saturated fat and cholesterol.

Methodology: The amaranth oil was extracted by organic solvent (n-hexane) and its content of squalene was determined. The potential hypocholesterolemic effect of this oil was evaluated by a bioassay, which employed 40 weanling hamsters. The animals were divided into four groups of 10, differentiated by the diets: control [normal diet with 20% corn oil] (C), hypercholesterolemic [diet with 12% fat coconut, 8% corn oil, and 0.1% cholesterol] (H) amaranth oil [identical to (H) with amaranth oil replacing corn oil] (A) and squalene [identical to (H) + squalene in the proportion found in the amaranth oil] (E). They were all formulated according to the recommendations of NRC (1995) and AIN-93. After 28 days, the animals had blood collected by cardiac puncture, under anesthesia, being measured total cholesterol,

triglycerides, HDL-C and plasma non-HDL cholesterol. After sacrifice, the livers of animals were collected for histological analysis and determination of cholesterol content. We also determined the levels of cholesterol and bile acids in the feces of animals. **Results:** There was no statistically significant difference in lipid profile and fecal excretion of cholesterol from animals in the hypercholesterolemic, amaranth oil and squalene groups. Fecal excretion of bile acids was higher in animals in groups of amaranth oil and squalene as compared with the control group and hypercholesterolemic group. The cholesterol content in liver of the animals from squalene group was higher compared to other groups, although this difference was not statistically significant except when compared to the control group. The highest grade of steatosis and parenchymal inflammation were found in the groups of amaranth oil and squalene. **Conclusions:** The amaranth oil and its component squalene had no effect hypocholesterolemic and promoted an increased excretion of bile acids in hamsters fed a diet containing high amounts of saturated fat and cholesterol.

Keywords: Amaranth oil. Squalene. Lipid metabolism. Hamsters.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 ASPECTOS GERAIS DO METABOLISMO LIPÍDICO	22
2.2 BIOSÍNTESE DO COLESTEROL	25
2.3 NUTRIÇÃO E DOENÇAS CARDIOVASCULARES	27
2.4 AMARANTO	29
2.4.1 Aspectos Históricos	29
2.4.2 Características Nutricionais	31
2.4.2.1 Proteínas	31
2.4.2.2 Amido	31
2.4.2.3 Fibra Alimentar	32
2.4.2.4 Vitaminas e Minerais	32
2.4.2.5 Lipídeos	33
2.4.2.5.1 Esqualeno	34
2.5 EFEITO DO AMARANTO E ESQUALENO NO METABOLISMO LIPÍDICO	36
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 MATÉRIA-PRIMA E EXTRAÇÃO LIPÍDICA	41
4.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA MATÉRIA-PRIMA	42

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS DE AMARANTO E MILHO	43
4.3.1 Determinação de Ácidos Graxos	43
4.3.2 Determinação de Esqualeno	44
4.3.3 Determinação de Esteróis	44
4.3.4 Determinação do Índice de Acidez	46
4.3.5 Determinação do Índice de Peróxido	46
4.3.6 Determinação do Índice de Refração	46
4.4 EXPERIMENTO BIOLÓGICO	47
4.4.1 Biotério	47
4.4.2 Animais	47
4.4.3 Dietas	48
4.4.3.1 Preparação das dietas	48
4.4.3.2 Composição centesimal das dietas	50
4.4.4 Consumo alimentar	50
4.4.5 Ganho de Peso	50
4.4.6 Análises no Plasma	51
4.4.7 Experimento piloto	51
4.4.8 Experimento Principal	54
4.4.9 Análises nas Fezes	58
4.4.9.1 Colesterol	58
4.4.9.2 Ácidos Biliares	59
4.4.10 Análises no Fígado	59
4.4.10.1 Colesterol	59
4.4.10.2 Análise Histológica	61

4.4.11 Análise Estatística	61
4.4.12 Aspectos Éticos	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 EXTRAÇÃO LIPÍDICA	63
5.2 CARACTERIZAÇÃO CENTESIMAL DA MATÉRIA-PRIMA	63
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS DE AMARANTO E MILHO	64
5.3.1 Perfil de Ácidos Graxos	64
5.3.2 Teor de Esqualeno	66
5.3.3 Conteúdo de Esteróis	67
5.3.4 Índices de Acidez, Peróxido e Refração	69
5.4 EXPERIMENTO BIOLÓGICO	70
5.4.1 Modelo Experimental Utilizado	70
5.5 EXPERIMENTO PILOTO	71
5.5.1 Composição Centesimal das Rações	71
5.5.2 Consumo de Ração e Peso dos Animais	73
5.5.3 Peso do Fígado	74
5.5.4 Perfil de Lipídeos Plasmáticos	75
5.6 EXPERIMENTO PRINCIPAL	76
5.6.1 Composição Centesimal das Rações	76
5.6.2 Consumo de Rações e Peso dos Animais	77
5.6.3 Peso do Fígado	79
5.6.4 Perfil de Lipídeos Plasmáticos	81
5.6.5 Teores de Ácidos Biliares e Colesterol nas Fezes	86
5.6.6 Análises no Fígado	88

5.6.6.1 Colesterol.....	88
5.6.6.2 Análise Histológica	90
6 CONCLUSÕES	100
7 REFERÊNCIAS	101
8 ANEXOS.....	116
ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética do Instituto de Medicina Tropical (IMT) da USP.....	117
ANEXO II – Aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da USP.....	118
ANEXO III – Aprovação do Sub-comitê de Ética Ambiental da Faculdade de Saúde Pública (FSP) da USP.....	119

Lista de Figuras

Figura 1	Esquema simplificado da rota biossintética do colesterol	25
Figura 2	(a) Planta do amaranto (b) Sementes de amaranto	30
Figura 3	Estrutura química do esqualeno	35
Figura 4	Planta de extração por solvente modelo Ecirtec, localizada no ITAL (Campinas-SP)	41
Figura 5	Animais dispostos em gaiolas individuais contendo maravalha autoclavada	48
Figura 6	Fluxograma representando o desenho do experimento piloto	54
Figura 7	Fluxograma representando o desenho do experimento principal	57
Figura 8	Óleo de amaranto (<i>Amaranthus cruentus</i>) bruto, extraído por solvente (n-hexano)	63
Figura 9	Relação peso do fígado/peso corporal dos animais dos grupos controle e hipercolesterolêmico	74
Figura 10	Relação peso do fígado/peso corporal dos animais dos grupos controle, hipercolesterolêmico, óleo de amaranto e esqualeno	80
Figura 11	Esteatose hepática média dos hamsters dos grupos controle, hipercolesterolêmico, óleo de amaranto e esqualeno	92
Figura 12	Fotomicrografia de secções de 5 µm de espessura do fígado coradas com HE, ilustrando o acúmulo de gordura hepática focal, em hamster do grupo controle	93
Figura 13	Fotomicrografia de secções de 5 µm de espessura do fígado coradas com HE, ilustrando ausência de esteatose e inflamação hepática, em hamster do grupo hipercolesterolêmico	94
Figura 14	Fotomicrografia de secções de 5 µm de espessura do fígado coradas com HE, ilustrando o acúmulo de gordura hepática difusa (grau 3+), em hamster do grupo óleo de amaranto	96

Figura 15	Fotomicrografia de secções de 5 µm de espessura do fígado coradas com HE, ilustrando a inflamação parenquimatosa grau 1+, em hamster do grupo óleo de amaranto	97
Figura 16	Fotomicrografia de secções de 5 µm de espessura do fígado coradas com HE, ilustrando a esteatose grau 2+, em hamster do grupo esqualeno	97
Figura 17	Fotomicrografia de secções de 5 µm de espessura do fígado coradas com HE, ilustrando a inflamação parenquimatosa grau 1+, em hamster do grupo esqualeno.	98
Figura 18	Fotomicrografia de secções de 5 µm de espessura do fígado coradas com HE, ilustrando o processo de apoptose, em hamster do grupo óleo de amaranto.	99

Lista de Tabelas

Tabela 1	Necessidades nutricionais de hamsters em fase de crescimento	49
Tabela 2	Composição planejada das dietas utilizadas no experimento piloto, representadas em g/kg	53
Tabela 3	Composição planejada das dietas utilizadas no experimento principal, representadas em g/kg	56
Tabela 4	Composição centesimal do amaranto integral (<i>Amaranthus cruentus</i> L., BRS-Alegria) e do farelo de amaranto desengordurado, representada em g/100 g de matéria-prima, em base seca	64
Tabela 5	Perfil dos principais ácidos graxos (%) dos óleos de amaranto e milho, utilizados nas dietas dos hamsters	65
Tabela 6	Concentração de esqualeno (%) dos óleos de amaranto e milho, utilizados nas dietas dos hamsters	66
Tabela 7	Teores de fitosteróis (campesterol, estigmasterol e β -sitosterol), em mg/100 g, dos óleos de amaranto e milho, utilizados nas dietas dos hamsters.	67
Tabela 8	Índices de acidez, peróxido e refração dos óleos de amaranto e milho, utilizados nas dietas dos hamsters	69
Tabela 9	Composição centesimal das rações utilizadas nos grupos controle e hipercolesterolêmico, representada em g/100g de dieta, em base seca	72
Tabela 10	Peso inicial, final, ganho de peso, ingestão total de ração, consumo diário médio e coeficiente de eficiência alimentar dos grupos controle e hipercolesterolêmico	73
Tabela 11	Concentração plasmática de colesterol total, HDL-colesterol, colesterol não-HDL e triglicérides dos animais (mg/dL) dos grupos basal, controle e hipercolesterolêmico	75
Tabela 12	Composição centesimal das dietas utilizadas nos grupos do experimento principal (controle, hipercolesterolêmico, óleo de amaranto e esqualeno), representada em g/100g de dieta, em base seca	77

Tabela 13	Peso inicial, final, ganho de peso, ingestão total de ração, consumo diário médio e coeficiente de eficiência alimentar dos hamsters do experimento principal	78
Tabela 14	Perfil lipídico dos hamsters do grupo basal e dos hamsters após 28 dias alimentando com as dietas do experimento principal	82
Tabela 15	Excreção fecal de ácidos biliares e colesterol dos hamsters dos grupos controle, hipercolesterolêmico, óleo de amaranto e esqualeno	86
Tabela 16	Colesterol do fígado dos animais dos grupos controle, hipercolesterolêmico, óleo de amaranto e esqualeno	88
Tabela 17	Escores de esteatose hepática e respectivos significados clínicos	91
Tabela 18	Escores de inflamação (parenquimatosa e portal) e respectivos significados clínicos	91

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACAT – Acil CoA Colesterol Aciltransferase

Acetil CoA – Acetil Coenzima A

AGL – Ácidos Graxos Livres

ANOVA – Análise de Variância

Apo B-100 – Apolipoproteína B-100

Apo E – Apolipoproteína E

CBAs – Compostos Bioativos

CEA – Coeficiente de Eficiência Alimentar

CG – Cromatografia Gasosa

CO₂ – Dióxido de Carbono

CT – Colesterol Total

DCNT – Doenças Crônicas Não Transmissíveis

DCV – Doenças Cardiovasculares

Fator_{rec} – Fator de Recuperação

FPP – Farnesilpirofosfato

GPP – Geranilpirofosfato

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

HE – Hematoxilina-Eosina

HMG-CoA redutase – 3-Hidroxi-3-Metilglutaril-Coenzima A redutase

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IDL – Lipoproteína de Densidade Intermediária

IPP – Isopentenilpirofosfato

KI – Iodeto de Potássio

kg – Kilograma

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

Lp(a) – Lipoproteína (a)

LPL – Lipase Lipoprotéica

M – Molar

meq – Miliequivalente

mg – Miligrama

nm – nanômetro

N – Normal

NRC – *National Research Council*

OMS – Organização Mundial da Saúde

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

TG – Triglicérides

VLDL – Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

BF₃ – Trifluoreto de Boro

dL – Decilitro

g – Grama

μL – Microlitro

μmol – Micromol

NaCl – Cloreto de Sódio

UV/VIS - Ultravioleta/Visível

°C – Graus Celsius

1 INTRODUÇÃO

Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são responsáveis por 58,5% das mortes ocorridas no mundo e por 45,9% da carga global de doenças (WHO, 2002).

Dentre as DCNT, destacam-se as doenças cardiovasculares (DCV), por serem a causa de um terço dos óbitos no Brasil, constituindo a principal causa de morte em nosso país (MALTA et al., 2006).

A alta proporção de morte precoce por DCV em algumas regiões metropolitanas do Brasil é comparável aos índices encontrados nos países do leste europeu, como na Hungria, que tem um dos coeficientes mais altos do mundo (GARCIA et al., 2002), sendo esse grupo de doenças cada vez mais apresentado e discutido como um dos maiores problemas de saúde pública (LAURENTI; BUCHALLA, 2001).

A elevação de LDL-colesterol (lipoproteína de baixa densidade) e diminuição da HDL-colesterol (lipoproteína de alta densidade) estão associadas com o aumento de doença coronariana em humanos e não humanos. Na maioria dos casos, o consumo elevado de gordura e colesterol altera a concentração e composição das lipoproteínas no plasma (MAGNONI; STEFANUTO; KOVACS, 2007).

De acordo com a *American Heart Association* (2002), mais de 30% da população brasileira apresenta altos níveis de colesterol (maior que 200 mg/dL), sendo este um dado preocupante, já que estudos mostram que taxas acima de 240 mg/dL de colesterol duplicam o risco de sofrer um ataque cardíaco.

Uma publicação da OMS sobre a relação entre a alimentação, a atividade física e as DCNT mostra que alguns componentes da dieta podem provocar efeitos adversos ao organismo. Esses componentes aumentam o risco de DCV quando consumidos em periodicidade e quantidades inadequadas. São alimentos ou preparações que contêm elevadas concentrações de colesterol, ácidos graxos saturados, ácidos graxos trans e sódio (WHO, 2003).

Por outro lado, há elementos dietéticos nos vegetais – cereais, leguminosas, frutas e hortaliças – relacionados à redução do risco de desenvolvimento de DCNT, como proteínas, fibras alimentares, antioxidantes e outras substâncias, além dos ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados presentes nos peixes e óleos vegetais (WHO, 2003). Sendo assim, a *American Heart Association* recomenda o aumento do consumo destes alimentos (RIQUE; SOARES; MEIRELLES, 2002; BARRETO et al., 2005).

A própria sociedade tem se mostrado mais preocupada com questões relacionadas à alimentação e saúde (FILHO; RISSIN, 2003; ANJO, 2004), onde existe atualmente um mercado em expansão, caracterizado pelo aumento da procura por alimentos funcionais (AMAYA-FARFÁN; MARCÍLIO; SPEHAR, 2005). Alimentos funcionais são aqueles que apresentam, além das funções nutricionais básicas, efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde (ANVISA, 1999). É neste contexto que se destaca a importância do amaranto.

O amaranto é um pseudocereal ainda pouco conhecido no Brasil, porém tem despertado interesse de pesquisadores devido às suas particularidades agrícolas, nutricionais e funcionais (PLATE; ARÊAS, 2002; FERREIRA; MATIAS; ARÊAS,

2007; MENDONÇA et al., 2009; CHÁVEZ-JÁUREGUI et al., 2010; ASSIS-VAZ; ARÊAS, 2010).

Estudos conduzidos com grãos de amaranto em animais demonstraram sua capacidade de reduzir os níveis séricos de colesterol (CHATUVERDI; SAROJINI; DEVI, 1993; PLATE; ARÊAS, 2002; MENDONÇA et al., 2009; ASSIS-VAZ; ARÊAS, 2010). Pesquisadores têm discutido quais substâncias seriam responsáveis pela propriedade hipocolesterolêmica do referido grão. Alguns atribuem esta capacidade à fibra alimentar solúvel (QURESHI; LEHMANN; PETERSON, 1996); outros à sua proteína (PLATE; ARÊAS, 2002; MENDONÇA et al., 2009; ASSIS-VAZ; ARÊAS, 2010); e alguns à presença do esqualeno, substância intermediária do metabolismo do colesterol, presente na fração lipídica do amaranto (CHATUVERDI; SAROJINI; DEVI, 1993).

Até o momento, poucos trabalhos se propuseram a avaliar o impacto exercido pelo óleo de amaranto sobre os níveis séricos de colesterol, já que os estudos têm se concentrado na investigação do efeito da proteína do amaranto no metabolismo lipídico.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito do óleo de amaranto e do esqualeno no metabolismo lipídico de hamsters alimentados com dieta contendo colesterol e gordura saturada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DO METABOLISMO LIPÍDICO

Dos pontos de vista fisiológico e clínico, os lipídeos biologicamente mais relevantes são os fosfolípides, o colesterol, os triglicérides (TG) e os ácidos graxos. Os fosfolípides formam a estrutura básica das membranas celulares e o colesterol é precursor dos hormônios esteróides, dos ácidos biliares e da vitamina D. Além disso, como constituinte das membranas celulares, o colesterol atua na fluidez destas e na ativação de enzimas aí situadas. Os triglicérides são formados a partir de três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol e constituem uma das formas de armazenamento energético mais importante no organismo, depositados nos tecidos adiposo e muscular (SPOSITO et al., 2007).

No organismo humano, o transporte de lipídeos é realizado através das lipoproteínas que são constituídas por um núcleo apolar de triglicérides e ésteres de colesterol, colesterol livre e apolipoproteínas, que são proteínas de peso molecular variável e que recebem nomenclatura alfa-numérica (apolipoproteínas AI, AII, AIV, B, CII e E), possuindo cada uma função distinta e específica no metabolismo das lipoproteínas (MAGNONI; STEFANUTO; KOVACS, 2007).

Existem quatro grandes classes de lipoproteínas separadas em dois grandes grupos: (i) as ricas em TG, maiores e menos densas, representadas pelos quilomícrons, de origem intestinal, e pelas lipoproteínas de densidade muito baixa ou “very low density protein” (VLDL), de origem hepática; e (ii) as ricas em colesterol

de densidade baixa “low density protein” (LDL) e de densidade alta “high density protein” (HDL). Existe ainda uma classe de lipoproteínas de densidade intermediária ou “intermediary density protein” (IDL) e a lipoproteína (a) [Lp(a)], que resulta da ligação covalente de uma partícula de LDL à apo(a) (SPOSITO et al., 2007).

Os quilomícrons são os responsáveis pelo transporte dos lipídeos da dieta e da circulação entero-hepática. Uma vez sintetizados, são lançados na linfa, atingindo a circulação sanguínea através do ducto torácico. Este se torna uma partícula de menor tamanho (quilomícron remanescente), pela retirada de seus ácidos graxos, ao sofrerem hidrólise de seus triglicérides pela ação da enzima lipase lipoprotéica (LPL). Os remanescentes são removidos da circulação para o fígado devido à ligação da apo E com o receptor de remanescentes neste órgão (GENEST, 2003).

Os ácidos graxos provenientes do quilomícron juntamente com os sintetizados no fígado são “re-empacotados” e secretados no sangue na forma de VLDL. Na circulação, as VLDL são hidrolisadas pela LPL, originando as IDL que contêm apo B-100 e apo E em sua superfície. As IDL têm dois destinos: são captadas da circulação pelo fígado, pela interação das apoproteínas com receptores hepáticos, ou processadas pela lipase hepática e se transformam em LDL, que permanecem por longo tempo no plasma (GENEST, 2003).

As LDL têm um conteúdo apenas residual de triglicérides e são compostas principalmente de colesterol e uma única apolipoproteína, a apo B-100. Estas lipoproteínas são removidas pelo fígado através dos receptores B/E. A expressão desses receptores é a principal responsável pela concentração de colesterol no sangue e depende da atividade da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-Coenzima A (HMG-

CoA) redutase, que é a enzima-chave intracelular para síntese do colesterol hepático (SPOSITO et al., 2007; BROWN; JESSUP, 2009).

O aumento da concentração intracelular de colesterol livre apresenta os seguintes efeitos regulatórios: inibição da HMG-CoA redutase, impedindo a síntese de colesterol; inibição da síntese de receptores de LDL; e estímulo da enzima acil Co-A colesterol aciltransferase (ACAT) para esterificação do colesterol citoplasmático (RADER; WILSON, 1995; ALVAREZ-LEITE; OLIVEIRA; PELUZIO, 2003).

Não existe uma via de catabolismo do colesterol, sendo este eliminado pelo fígado como ácidos biliares secretados na bile (RADER; WILSON, 1995; ALVAREZ-LEITE; OLIVEIRA; PELUZIO, 2003).

As LDL são, portanto, as principais lipoproteínas transportadoras de colesterol hepático para os tecidos periféricos e apresentam propriedades aterogênicas, visto que há evidente associação entre elevadas concentrações desta lipoproteína e o aumento da aterosclerose, que consiste em uma complexa e crônica inflamação que ocorre nas artérias de médio e grande calibre (BERLINER et al., 1995; STEFFENS; MACH, 2004; VAN DER LAAN et al., 2004).

Por outro lado, a HDL remove o excesso de colesterol dos tecidos, transportando-os para o fígado, o que caracteriza o transporte reverso de colesterol (TRC) (LOTTENBERG, 2009; DANIELS et al., 2009). A HDL também tem outras ações que contribuem para a proteção do leito vascular contra a aterogênese, tais como a remoção de lipídeos oxidados da LDL, inibição da fixação de moléculas de adesão e monócitos ao endotélio e estimulação da liberação de óxido nítrico (SPOSITO et al., 2007).

2.2 BIOSSÍNTESE DO COLESTEROL

O colesterol é sintetizado nos mamíferos a partir da acetil-coenzima A (acetil-CoA), uma molécula produzida durante o metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios. Existem, no mínimo, 21 passos na via biossintética do colesterol (ZUBAY, 1999).

A síntese endógena do colesterol está esquematizada na figura abaixo.

Figura 1 – Esquema simplificado da rota biossintética do colesterol.

A primeira etapa desta síntese envolve a condensação sequencial de três moléculas de acetil-CoA pelas enzimas acetil-CoA C acetiltransferase e HMG-CoA sintase (LYNEN, 1953). Estas reações originam a 3-hidroxi-3-metilgluratil-CoA (HMG-CoA), que é posteriormente reduzida pela HMG-CoA redutase microsomal a

mevalonato, composto de cinco átomos de carbono (BUCHER; OVERATH; LYNEN, 1960). Este passo irreversível é a etapa limitante da síntese de colesterol e de extrema importância clínica, uma vez que as drogas de primeira escolha no tratamento da hipercolesterolemia são inibidores reversíveis e competitivos da HMG-CoA redutase (SABARENSE; PELUZIO, 2008).

A HMG-CoA redutase tem sua atividade regulada pelo colesterol intracelular, ou seja, quando há excesso ou deficiência de colesterol no ambiente intracelular, esta enzima tem sua atividade diminuída ou aumentada, respectivamente (CHAMPE; HARVEY, 2002; ALVAREZ-LEITE; PELUZIO, 2003).

Fosforilações do ácido mevalônico, dependentes de ATP, e subsequente descarboxilação produzem o isopentenilpirofosfato (IPP), a molécula doadora para todos os compostos poliisoprenóides. As enzimas preniltransferase geram os ésteres pirofosfatoalílicos geranilpirofosfato (GPP) e farnesilpirofosfato (FPP). Duas moléculas de FPP são então unidas enzimaticamente, resultando na formação do esqualeno (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

Após sua biossíntese, o esqualeno pode ser incorporado aos tecidos do corpo, principalmente ao epitelial, ou ser novamente metabolizado, dando origem ao lanosterol, que após várias etapas, incluindo a perda de três grupamentos metila, originará o colesterol e outros esteróides (STRYER, 1998; KOOLMAN; ROHM, 1996; MO; ELSON, 1994; KELLY, 1999).

2.3 NUTRIÇÃO E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Fatores ambientais, incluindo a dieta, exercem um importante papel no desenvolvimento das doenças cardiovasculares (SANTOS et al., 2006; STEEBURGO; DALL'ALBA; GOSS, 2007).

A gordura saturada é a principal causa alimentar de elevação do colesterol plasmático, pois reduz os receptores celulares B-E, inibindo a redução plasmática das partículas de LDL, permitindo, além disso, maior entrada de colesterol nessas partículas. Os ácidos graxos saturados estão presentes principalmente na gordura animal (carnes gordurosas, leite integral e derivados), polpa de coco e alguns óleos vegetais (dendê e coco) (RIQUE; SOARES; MEIRELLES, 2002).

Estudos recentes indicaram que os ácidos graxos monoinsaturados *trans* também aumentam as concentrações de LDL. Estes ácidos graxos são produzidos por hidrogenação de óleos vegetais. A configuração *trans* confere-lhes propriedades estruturais semelhantes às dos ácidos graxos saturados, o que pode explicar a sua ação de elevar as concentrações séricas de LDL (SHILS et al., 2003).

Em relação ao colesterol dietético, sabe-se que a dieta contribui pouco (300 mg/dia) para a totalidade do colesterol presente no lúmen intestinal, sendo a bile a principal fonte (800-1200 mg/dia), razão pela qual o colesterol alimentar exerce menor influência sobre a colesterolemia. Apesar de o colesterol dietético relacionar-se à elevação do colesterol plasmático, seu efeito é menor quando comparado à ingestão dos ácidos graxos saturados e *trans*, ou mesmo ao consumo total de gordura (LOTTENBERG, 2009). São considerados alimentos fontes de colesterol as vísceras,

frutos do mar, gema de ovo, pele de aves, embutidos e frios (RIQUE; SOARES; MEIRELLES, 2002).

A constatação de que dietas ricas em vegetais, como a da população mediterrânea contemporânea e da população asiática, reduzem o risco das DCNT, impulsionou pesquisas que identificaram substâncias nutrientes e não nutrientes atuantes em alvos fisiológicos específicos e que, dessa forma, interferem nos processos patológicos dessas doenças (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009).

Atualmente tem sido considerado que a ingestão insuficiente de compostos bioativos (CBAs) provenientes de vegetais constitui importante componente de risco das DCNT, contribuindo na mesma magnitude do consumo excessivo de energia e de gorduras totais e saturadas da dieta (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009).

Os grãos são ricas fontes de CBAs como os compostos fenólicos, carotenóides, vitamina E, lignanas, inulina, amido resistente, esteróis, tocoferóis, tocotrienóis, dentre outros. Os efeitos aditivos e sinérgicos destes compostos podem ser responsáveis pelos benefícios à saúde promovidos pelas dietas ricas em frutas, verduras, legumes e grãos integrais, como a redução do risco de DCNT (LIU, 2004).

Investigações recentes demonstram que alimentos a base de soja possuem potencial efeito protetor sobre uma variedade de doenças crônicas, especialmente as doenças cardiovasculares (CLARKSON, 2002). Numerosos estudos em humanos e animais mostram que o consumo da proteína de soja reduz o colesterol total sérico e o LDL-c, que são os principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares (FUKUI et al, 2004; REYNOLDS et al., 2006).

Outros alimentos, como o amaranto, por apresentarem compostos bioativos, também mostraram marcado efeito hipocolesterolêmico em animais e se somam aos

já estudados que potencialmente podem trazer benefício na prevenção de doenças cardiovasculares (PLATE; ARÊAS, 2002; MENDONÇA et al., 2009, ASSIS-VAZ; ARÊAS, 2010).

2.4 AMARANTO

2.4.1 Aspectos Históricos

O amaranto é um pseudocereal da classe das dicotiledôneas, domesticado na América há mais de 6.000 anos pelas civilizações que nela se desenvolveram, sendo posteriormente expandido por outras partes do mundo (SPEHAR, 2007).

O amaranto foi cultivado na América pelos Incas, Maias e Astecas, sendo considerado um alimento sagrado. Suas sementes eram utilizadas em cerimônias religiosas, porém, com a chegada dos colonizadores espanhóis, estas práticas e o seu cultivo foram proibidos. Assim, o cultivo do amaranto ficou restrito a apenas algumas regiões dos Andes (SAUNDERS; BECKER, 1984; YÁNEZ et al., 1994).

A partir dos anos 60 do século passado várias culturas andinas foram restabelecidas num processo de recuperação cultural que aconteceu principalmente no Perú e o amaranto foi uma destas. Mais tarde, em 1975, quando a *National Academy of Sciences* passou a considerar o amaranto como uma das culturas mais promissoras e recomendadas para alimentação humana devido suas características nutricionais, este ressurgiu mundialmente (SAUNDERS; BECKER, 1984). Desde então as atividades de pesquisa envolvendo o amaranto aumentaram

significativamente. As três espécies mais estudadas e cultivadas em todo o mundo para o consumo humano são *Amaranthus cruentus* L., *Amaranthus caudatus* L. e *Amaranthus hypocondriacus* L. (BREENE, 1991).

A planta do amaranto (Figura 2a) se desenvolve de forma vigorosa, com inflorescências (panículas ou cachos) coloridas, com variações do amarelo ao roxo. Apresenta rápido crescimento e pode atingir até 2,0 m, com a inflorescência de até 0,6 m, dependendo do manejo e suprimento de água. As sementes são muito pequenas e arredondadas (Figura 2b), e quando amadurecem, ao cair no solo, germinam rapidamente na presença de umidade (SPEHAR et al., 2003).

Figura 2 – (a) Planta do amaranto. Fonte: flowersgallery.net (b) Sementes de amaranto.

Recentemente o amaranto foi adaptado ao clima e solo brasileiros pela Embrapa Cerrados (Planaltina-DF), recebendo a denominação *Amaranthus cruentus* L., variedade BRS – Alegria (SPEHAR et al., 2003; TEIXEIRA; SPEHAR; SOUZA, 2003). O nome alegria refere-se a um confeito mexicano preparado com grãos de amaranto estourados e unidos com xarope de glicose ou caramelo (BREENE, 1991).

2.4.2 Características Nutricionais

2.4.2.1 Proteínas

Apesar da baixa biodisponibilidade das proteínas de origem vegetal, o teor protéico do amaranto e seu perfil de aminoácidos fazem com que seja uma atrativa fonte protéica, apresentando teores elevados de aminoácidos essenciais, especialmente lisina (5%) e aminoácidos sulfurados (4%), limitantes nos grãos comuns (JAHANIAVAL; KAKUDA; MARCONE, 2000; ESCUDERO et al., 2004; FERREIRA; MATIAS; ARÊAS, 2007; MENDONÇA et al., 2009).

O amaranto, assim como a soja, apresenta as globulinas como sua principal forma de proteína de estocagem. A fração gliadina do trigo, uma prolamina, que é responsável pelas reações alérgicas relacionadas à doença celíaca, não é encontrado no amaranto, o que o faz apropriado para dietas isentas de glúten (GORINSTEIN et al., 2002).

2.4.2.2 Amido

O amido é o componente mais abundante do amaranto, representando 50 a 60% do total do grão (SAUNDERS; BECKER, 1984). Os grânulos de amido são os menores encontrados na natureza, medindo de 1 a 3 μm de diâmetro, menor que outros grânulos de amido como os do arroz, que variam de 3 a 8 μm e os da batata que alcançam 100 μm de diâmetro (BREENE, 1991).

Guerra-Matias e Arêas (2004, 2005) verificaram alta digestibilidade do extrusado do amido do grão de amaranto, quando comparado com o controle de pão branco. O Índice de Hidrólise *in vitro* e Índice Glicêmico foram 103 e 107, respectivamente. Estes resultados foram atribuídos ao pequeno tamanho do grânulo de amido e sua baixa temperatura de gelatinização (FERREIRA; MATIAS; ARÊAS, 2007).

2.4.2.3 Fibra Alimentar

O amaranto possui alto conteúdo de fibra alimentar, concentrações que variam de 4 a 8% (GUZMÁN-MALDONADO; PAREDEZ-LOPEZ, 2000; TOSI; CIAPPINI; MASCIARELLI, 1996. É considerado excelente fonte de fibras insolúveis, compostas principalmente por celulose e lignina, com teores superiores ao encontrado em cereais (SAUNDERS; BECKER, 1984).

2.4.2.4 Vitaminas e Minerais

O amaranto apresenta maior teor de riboflavina e ácido ascórbico que os cereais como trigo, aveia, cevada, centeio, arroz e milho (BRESSANI, 1983). Nas variedades de *Amaranthus cruentus* podem ser encontradas de 0,19 a 0,23 mg/100g de riboflavina, 1,17 a 1,45 mg/100g de niacina, até 4,5 mg/100g de ácido ascórbico e de 0,07 a 0,1 mg/100g de tiamina (ASCHERI; CARVALHO; SPEHAR, 2004).

O amaranto ainda é considerado boa fonte de minerais, com conteúdo variando, dependendo da espécie, de 141 a 241 mg/100g de cálcio; de 12,5 a 13,9 mg/100g de ferro; de 2,95 a 3,95 mg/100g de zinco; de 2,03 a 4,53 mg/100g de manganês; e de 478 a 510 mg/100g de fósforo (FERREIRA; MATIAS; ARÊAS, 2007).

2.4.2.5 Lipídeos

O amaranto também contém teor de lipídeos superior ao de outros cereais (GAMEL et al., 2007). A relação ácidos graxos insaturados/saturados é de 3:1 (CHAVEZ-JÁUREGUI; SILVA; ARÊAS, 2000). Os ácidos graxos poliinsaturados são representados em elevada proporção (77%) (MARTIROSYAN et al., 2007), sendo 50% destes constituídos de linoléico (C_{18:2}) e 25% de oléico (C_{18:1}) (GAMEL et al., 2007).

Alguns dos compostos importantes encontrados na fração insaponificável do óleo de amaranto são os fitosteróis, que exercem papel importante na redução do colesterol plasmático. Marcone, Kakuda e Yada (2004) identificaram neste óleo os fitosteróis mais comuns na natureza (β -sitosterol, campesterol e estigmasterol) e verificaram que o total destes foi superior ao de outros óleos vegetais, como oliva, soja e algodão.

O óleo de amaranto destaca-se também pela presença dos isômeros da vitamina E (LEHMANN; PUTNAM; QURESHI, 1994), compostos que apresentam ação antioxidante no organismo animal, retardando o envelhecimento e prevenindo

doenças crônicas não-transmissíveis, como as doenças cardiovasculares. Além de tal ação benéfica no organismo de animais, em vegetais é observado que estes compostos são capazes de impedir a degradação da membrana celular, evitando que os lipídeos sofram peroxidação. Do total destas substâncias no óleo de amaranto, 43% correspondem aos tocoferóis, 47% aos β -tocotrienóis e 8% a outros tocotrienóis (QURESHI; LEHMANN; PETERSON, 1996).

O óleo de amaranto se mostra bastante semelhante ao óleo de milho na sua composição em ácidos graxos (LYON; BECKER, 1987). Entretanto, possui um diferencial por sua fração insaponificável ser rica em esqualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetrahexaneno) (BERGANZA et al., 2003; HAN-PING et al., 2003).

2.4.2.5.1 Esqualeno

O esqualeno recebeu esta denominação por ter sido isolado pela primeira vez do óleo de fígado do tubarão (*Squalus* spp), estando presente em abundância nesse óleo (aproximadamente 56%) e em pequenas quantidades nos óleos vegetais (ZHANG et al., 2002; HUANG; LIN; FANG, 2009). O óleo de oliva, considerado um dos óleos vegetais mais ricos em esqualeno, apresenta de 0,4 a 0,5% deste composto (BERGANZA et al., 2003). Sendo assim, o óleo de amaranto pode ser considerado uma atrativa fonte de esqualeno, que constitui aproximadamente 8% deste óleo (HAN-PING; CORKE, 2003).

CC(C)=CCCC(C)=CCCC(C)=CCC=C(C)CCC=C(C)CCC=C(C)C

Em alguns estudos foi observada atividade anticarcinogênica do esqualeno, baseado na observação de inibição do desenvolvimento de neoplasia após sua administração em roedores (ELSON; YU, 1994; CROWELL, 1999), sendo demonstrada sua atividade inibitória em modelos carcinogênicos de pele (VAN DUREN; GOLDSCHIMIDT, 1976; MURAKOSHI et al., 1992; DESAI; WEI; LAMARTINIERE, 1996), cólon (RAO; NEWMARK; REDDY, 1998) e pulmão (SMITH et al., 1998). Outros estudos em animais demonstram que o esqualeno

também apresenta efeito de redução dos níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides (RICHTER; SCHAFER, 1982; FARVIN et al., 2006).

2.5 EFEITO DO AMARANTO E ESQUALENO NO METABOLISMO LIPÍDICO

Alguns estudos demonstram que o amaranto apresenta efeito hipocolesterolêmico (CHATUVERDI; SAROJINI; DEVI, 1993; GRAJETA, 1997; PLATE; ARÊAS 2002; MENDONÇA et al, 2009; ASSIS-VAZ; ARÊAS, 2010), porém a identificação do componente que exerce maior impacto sobre os níveis plasmáticos de colesterol ainda é objeto de investigação e discussão.

Dentre as hipóteses formuladas para justificar este efeito, pode-se citar o perfil de aminoácidos da proteína do amaranto, seu teor de fibras totais e solúveis, proporção de ácidos graxos insaturados e presença de fitoquímicos, tais como o esqualeno (FERREIRA; MATIAS; ARÊAS, 2007).

Chatuverdi, Sarojini e Devi (1993) observaram o efeito hipocolesterolêmico do amaranto da espécie *Amaranthus esculentus* através da administração do grão a ratos Wistar, verificando redução dos níveis de lipídeos plasmáticos, triglicérides e aumento das partículas de HDL.

Grajeta (1997), em estudo semelhante, observou redução de 33% a 37% do colesterol total, quando ratos foram alimentados com dieta contendo amaranto (*Amaranthus cruentus*) integral e desengordurado, respectivamente.

Mendonça et al. (2009) observaram em ensaio com hamsters hipercolesterolêmicos, redução do colesterol plasmático com a administração do isolado protéico do grão da espécie *Amaranthus cruentus*. Foi observada redução de 23% do colesterol total ao longo dos 28 dias de experimento, e concluiu-se que a proteína do amaranto é a fração responsável majoritariamente pelo efeito hipocolesterolêmico do referido pseudocereal.

Mais recentemente, Assis-Vaz e Arêas (2010) verificaram redução de 36% e 37% do colesterol total e triglicérides, respectivamente, quando ratos Wistar consumiram isolado protéico de amaranto e 1% de colesterol, em relação ao grupo controle, que recebeu caseína como fonte protéica e a mesma quantidade de colesterol.

Embora tenha sido bem demonstrado o efeito do amaranto integral e de sua proteína na redução dos níveis de colesterol sérico, a ação do óleo de amaranto e do esqualeno no metabolismo lipídico apresenta resultados controversos.

Plate e Arêas (2002) administraram amaranto da espécie *Amaranthus caudatus* na forma de grão extrusado e óleo, em dietas distintas, a coelhos hipercolesterolêmicos. Foi observado que a redução nos níveis de colesterol total e LDL após 21 dias foi mais efetiva para o amaranto extrusado (50%), quando comparado aos grupos controle (que recebeu óleo de girassol) e óleo de amaranto. Sendo assim, os autores concluíram que componentes do grão livre de lipídeos e, conseqüentemente, das demais substâncias lipossolúveis, foram suficientes para responder pelo efeito hipocolesterolêmico.

Scolastici, Ong e Moreno (2004) administraram esqualeno dissolvido em óleo de milho, em ratos Wistar por gavagem (100 ou 150 mg/100 g peso corporal)

diariamente, durante 8 semanas consecutivas. Ao final do estudo, verificou-se um aumento nos níveis séricos de colesterol total em ambos os grupos suplementados com esqualeno, quando comparados ao grupo controle (que recebeu apenas óleo de milho). Similarmente, Nakamura et al. (1997) observaram um aumento nas concentrações de colesterol plasmático após 6 horas de administração de 86,22 mg deste triterpeno, por gavagem, em ratos Wistar.

Por outro lado, podem-se citar alguns estudos que avaliaram o efeito do óleo de amaranto e esqualeno no metabolismo lipídico de animais e que obtiveram resultados diferentes.

Berger et al. (2003a) observaram que dieta contendo 5% de óleo de amaranto foi capaz de reduzir o colesterol total e colesterol não-HDL de hamsters hipercolesterolêmicos em 15 e 22%, respectivamente, em relação ao grupo controle (que recebeu óleo de milho).

Shin et al. (2004), em ensaio com ratos Wistar, observaram que o esqualeno obtido do óleo de amaranto promoveu queda nos níveis séricos de colesterol total, triglicérides e aumento do HDL-colesterol. Foi também observado aumento da excreção fecal de colesterol e ácidos biliares.

Strandberg, Tilvis e Miettinen (1990) ofereceram 900 mg de esqualeno diariamente a humanos, por um período de 7-30 dias, e não observaram aumentos consistentes nos níveis de colesterol, enquanto Chan et al. (1996) ofereceram 860 mg de esqualeno diariamente a pacientes hipercolesterolêmicos por um período de 20 semanas e encontraram uma diminuição estatisticamente significativa nos níveis plasmáticos de colesterol total.

Alguns autores apontam o efeito inibitório do esqualeno na atividade da HMG-CoA redutase (SHIN et al., 2004), sendo tal efeito relacionado a um mecanismo de retro-alimentação (“feedback”), ocasionando a redução de uma série de intermediários, tais como o mevalonato, farnesilpirofosfato e geranilpirofosfato, diminuindo assim a produção do colesterol (STRANDBERG; TILVIS, MIETTINEN, 1989; FARVIN; SURENDRARAJ; ANANDAN, 2009).

Como ainda não há consenso a respeito da dose ou mesmo da resposta do colesterol plasmático em relação ao consumo do óleo de amaranto e/ou esqualeno, faz-se necessária uma investigação buscando elucidar o efeito dos mesmos no metabolismo lipídico.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial efeito hipocolesterolêmico do óleo de amaranto e esqualeno em hamsters alimentados com dieta contendo colesterol e gordura saturada.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar nutricionalmente o óleo de amaranto, determinando o perfil de ácidos graxos e os teores de esqualeno e fitosteróis (β -sitosterol, campesterol e estigmasterol);
- Avaliar, no plasma de hamsters hipercolesterolêmicos, a capacidade do óleo de amaranto em melhorar o perfil lipídico;
- Determinar o efeito do consumo deste óleo na excreção fecal de colesterol e ácidos biliares, no perfil de lipídeos plasmáticos e deposição de lipídeos hepáticos de hamsters hipercolesterolemizados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA E EXTRAÇÃO LIPÍDICA

O amaranto (*Amaranthus cruentus* L., BRS-Alegria) foi fornecido pela Celeiro Alimentos (Planaltina – DF), e após retirada de sujidades, procedeu-se à etapa de extração lipídica, realizada no Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), localizado em Campinas-SP.

Inicialmente, 90 kg de amaranto foram submetidos ao processo de prensagem a frio, utilizando uma prensa modelo Ecirtec MPE-40, para que fossem laminados, a fim de aumentar a superfície de contato com o solvente.

A etapa seguinte foi a extração direta com n-hexano PA utilizando a planta de extração por solvente (Figura 4).

Figura 4 – Planta de extração por solvente modelo Ecirtec, localizada no ITAL (Campinas-SP).

A amostra proveniente do processo de prensagem (torta residual) foi lavada duas vezes com o solvente a 50 °C, sendo a primeira lavagem por um período de 30 minutos e a segunda, 20 minutos. Após o término da extração, o solvente foi evaporado a 70 °C e o óleo coletado. A matéria-prima restante foi denominada farelo de amaranto desengordurado.

Durante o estudo, o óleo de amaranto foi armazenado, a temperatura ambiente, em frasco de vidro âmbar para preservá-lo da luz e do ar. O mesmo procedimento foi realizado com o óleo de milho comercial, refinado, da marca Liza (utilizado nas outras rações deste estudo).

Sempre que era necessário abrir os frascos, ao final introduzia-se nitrogênio nos mesmos antes de tampá-los, para que os óleos não ficassem em contato com o ar atmosférico.

4.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA MATÉRIA-PRIMA

Os teores de umidade, cinzas, lipídeos e proteína do amaranto integral e do farelo de amaranto desengordurado foram determinados de acordo com os métodos 950.46, 923.03, 920.39C e 960.52 da AOAC (2003), respectivamente. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O teor de cardoidratos totais foi calculado por diferença.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS DE AMARANTO E MILHO

4.3.1 Determinação de Ácidos Graxos

Os ácidos graxos foram determinados, em triplicata, como ésteres metílicos de ácidos graxos por meio de cromatografia gasosa (CG) em equipamento “Shimadzu” modelo GC-2010. Uma alíquota de 150 mg de lipídio foi tomada e submetida à saponificação com NaOH 0,5N em metanol. Em seguida, foi esterificada com BF₃ em metanol com aquecimento a 100 °C durante 2 minutos em banho Maria (MORRISON; SMITH, 1964).

Os ésteres metílicos foram extraídos a frio utilizando hexano como solvente e cerca de 5 mL de hexano contendo os éteres ficaram sob refrigeração até injeção em cromatógrafo gasoso.

Posteriormente, os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados e identificados por cromatografia gasosa, em equipamento da marca Shimadzu, modelo GC2010. As condições cromatográficas foram: coluna capilar de sílica fundida da marca Supelco, modelo SP-2560, com 100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,20 µm de filme; gás de arraste hidrogênio a 1,0 mL/min; injetor “splitter” a 250 °C, com razão de “split” de 1:20; detector FID a 270 °C; programação da coluna: temperatura inicial de 140 °C mantida por 5 min., posterior elevação de 4 °C/min até 230 °C e 5 °C/min até 240 °C. O volume injetado de cada extrato no cromatógrafo foi de 1 µL e a identificação ocorreu por comparação do tempo de retenção corrigido entre ésteres metílicos dos ácidos graxos das amostras e

padrões. Utilizou-se como padrão o Fatty acid methyl ester mixtures 47885 da Sigma-Aldrich. A análise foi qualitativa, sendo a proporção de cada ácido graxo calculada dividindo-se a área do seu pico pela área total da corrida.

4.3.2 Determinação de Esqualeno

Inicialmente, a fração insaponificável foi isolada, sendo tomada uma alíquota de 3 g de óleo de amaranho (ou milho) e dissolvida em uma mistura de 30 mL de etanol 95% e 5 mL de KOH 50%, agitando-se por 1 hora. Logo após, a mistura foi lavada com 40 mL de etanol 95% e então diluída para 80 mL com água destilada. Os insaponificáveis foram extraídos 5 vezes utilizando-se 50 mL de éter de petróleo por vez (HE et al., 2002).

A análise do esqualeno foi feita por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography* – cromatografia líquida de alta eficiência), sendo o volume de injeção de 20 µL e a fase móvel uma mistura de acetona/acetonitrila (40:60 v/v). O fluxo isocrático utilizado foi de 1 mL/min, a detecção feita a 208 nm (UV/visível) e o tempo de corrida foi de 20 minutos (NENADIS; TSIMIDOU, 2002). A análise foi realizada em triplicata. Utilizou-se como padrão o squalene 3626 da Sigma-Aldrich.

4.3.3 Determinação de Esteróis

Para a determinação dos fitosteróis, utilizou-se o método descrito por Almeida e Bragagnolo (2009). Inicialmente pesou-se 0,3 g de amostra e adicionou-se

10 mL de KOH etanólica (3%). Aqueceu-se em banho maria a 50 °C por 3 horas. Em seguida resfriou-se a amostra adicionando 10 mL de água destilada. Extraíu-se 4 vezes com 10 mL de hexano e secou-se sob fluxo de N₂. Adicionou-se 1 mL de padrão interno dihidrocolesterol e injetou-se em cromatógrafo gasoso.

Foi utilizado o cromatógrafo gasoso (HP, modelo 6890), equipado com amostrador automático; injetor em modo split, razão 50:1; coluna capilar HP-5MS (30 m, 0,25 mm d.i, 0,25 µL de filme); detector por ionização em chama. As condições cromatográficas foram otimizadas com base na metodologia de Schmarr et al. (1996) sendo: temperatura da coluna programada, temperatura inicial 150 °C/0,1 min, elevando-se para 300 °C em uma escala de 10 °C/min, permanecendo nesta temperatura por 10 minutos; gás arraste de hélio, vazão de 1 mL/min; detector de ionização em chama: gás “make-up”, nitrogênio a 30 mL/min., hidrogênio 30 mL/min. e ar sintético 300 mL/min. e temperatura de 300 °C; injetor: temperatura 250 °C.

A identificação dos picos foi realizada através da comparação do tempo de retenção das amostras com os padrões (campesterol 5157; β-sitosterol 9889 e stigmasterol 2424, Sigma-Aldrich), por cromatografia e a quantificação por padronização interna, utilizando como padrão interno dihidrocolesterol (Sigma-Aldrich). As análises foram feitas em triplicata.

4.3.4 Determinação do Índice de Acidez

Definido como o número de mg de hidróxido de potássio (KOH) necessário para neutralizar os ácidos graxos livres presentes em 1g de amostra. Foi utilizado o método AOCS Ca 5a-40 (2003).

4.3.5 Determinação do Índice de Peróxido

O índice de peróxido determina todas as substâncias que oxidam o iodeto de potássio (KI), em miliequivalentes de peróxido por 100 g de amostra, sob as condições de teste. Essas substâncias são geralmente consideradas como peróxidos ou outros produtos similares da oxidação de gorduras. O método utilizado para esta análise foi o Cd 8-53 da AOCS (2003).

4.3.6 Determinação do Índice de Refração

O índice de refração em óleos é característico para cada tipo de óleo, ou seja, está intimamente relacionado com o seu grau de saturação, mas é afetado por outros fatores tais como teor de ácidos graxos livres, oxidação e tratamento térmico. Foi empregado o método proposto pela AOCS Cc 7-25 (2003), mediante Refratômetro de Abbé (40 °C).

4.4 EXPERIMENTO BIOLÓGICO

4.4.1 Biotério

O experimento biológico foi realizado no biotério de experimentação para hamster do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT/USP).

4.4.2 Animais

Foram utilizados hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos, da linhagem Golden Syrian, recém-desmamados (aproximadamente 21 dias), com padrão sanitário convencional, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP.

Os animais foram dispostos em gaiolas individuais contendo maravalha autoclavada (Figura 5), em local arejado, com temperatura em torno de 20 a 25 °C, sendo expostos 12 horas à claridade e 12 horas ao ambiente escuro.

As rações e a água foram fornecidas *ad libitum* aos animais, e a pesagem dos animais e limpeza das gaiolas realizadas uma e três vezes por semana, respectivamente.

Figura 5 – Animais dispostos em gaiolas individuais contendo maravalha autoclavada.

4.4.3 Dietas

4.4.3.1 Preparação das dietas

As dietas dos animais seguiram as recomendações nutricionais da *National Research Council* (NRC) (1995) e foram formuladas com uma mistura de minerais e vitaminas adequadas ao crescimento de hamsters, de acordo com as recomendações para roedores da AIN-93 (REEVES; NIELSEN; TAHEY, 1993).

Na Tabela 1 se encontram as recomendações nutricionais para hamsters em fase de crescimento (animal com 35 a 130 g).

Tabela 1 - Necessidades nutricionais de hamsters em fase de crescimento.

Componentes da dieta	Quantidade (g/100 g)
Fibras	5 a 15
Carboidratos	65
Lipídeos	4 a 20
Proteínas	18 a 24
Total	100

Fonte: National Research Council, 1995

As dietas foram recebidas em pó, para serem reconstituídas com água destilada. Optou-se por adicionar os óleos (amaranto, milho e milho + esqualeno) em laboratório, evitando assim eventuais oxidações durante os processos industriais de fabricação das rações.

Os óleos (quantidades a serem relatadas posteriormente) foram adicionados às dietas em pó, sendo a mistura homogeneizada com o auxílio de uma colher. Para cada 100 g da mistura dieta em pó + óleo, foi adicionado 50 mL de água destilada, sendo a massa formada novamente homogeneizada.

Em seguida, a massa foi disposta em formas de gelo e armazenada a -20 °C por aproximadamente 4 horas. Os *pellets* formados foram retirados das formas e liofilizados por 4 horas, sendo posteriormente colocados em sacos plásticos e armazenados a -20 °C até o momento de serem oferecidos aos animais.

4.4.3.2 Composição centesimal das dietas

Os teores de umidade, cinzas, lipídeos e proteína das dietas foram determinados de acordo com os métodos 950.46, 923.03, 920.39C e 960.52 da AOAC (2003), respectivamente. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O teor de cardoidratos totais foi calculado por diferença.

4.4.4 Consumo alimentar

A ingestão dos animais foi avaliada diariamente durante todo o ensaio biológico. A quantidade de ração ingerida foi determinada pela diferença entre a quantidade de ração ofertada e a sobra no comedouro.

4.4.5 Ganho de Peso

Os animais foram pesados semanalmente, no mesmo horário, em balança digital semi analítica, durante todo o período experimental, para avaliar o ganho de peso.

A partir da razão entre ganho de peso e a quantidade de ração consumida, foi calculado o coeficiente de eficiência alimentar (CEA) de cada dieta ofertada.

4.4.6 Análises no Plasma

As análises no plasma foram realizadas pelo Laboratório de Controle de Qualidade Genética e Sanitária Animal da Divisão de Apoio ao Ensino e a Pesquisa do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP.

Para os procedimentos de coleta de sangue, os animais foram anestesiados em câmara de CO₂.

O sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca e acondicionado em tubos *eppendorf* contendo anticoagulante heparina (Liquemine), com concentração final de aproximadamente 1 mg/mL, sendo logo em seguida submetido a centrifugação a baixa velocidade (1.000 g, 15 min, 4 °C) para obtenção do plasma (WRIGHT; SALTER, 1998). Após a coleta do sangue, os animais foram sacrificados por exsanguinação.

As concentrações de colesterol total (CT), triglicérides (TG) e lipoproteína de alta densidade (HDL) foram determinadas usando o sistema Cobas-Mira (*Roche Diagnostics*, USA).

O colesterol não-HDL (LDL-c + VLDL-c) foi calculado pela subtração do colesterol total pelo HDL colesterol.

4.4.7 Experimento piloto

Foi realizado um experimento piloto com o objetivo de testar a capacidade da dieta de induzir a hipercolesterolemia nos animais, sendo a formulação desta baseada

em outros trabalhos que desenvolveram estudos semelhantes utilizando hamsters (TERPSTRA et al., 1998; LUCAS et al., 2001; FROTA et al., 2008; ISHIMOTO; TORRES, 2008; MENDONÇA et al., 2009; FONTANARI; BATISTUTI; ARÊAS, 2010).

Foram utilizados nove hamsters, que passaram inicialmente por um período de adaptação de 7 dias recebendo *ad libitum* a ração comercial Nuvilab CR1 (Nuvital). Esta ração tem composição declarada pelo fabricante de proteína mínima 22%, extrato etéreo mínimo 4%, matéria mineral máxima 10%, matéria fibrosa máxima 8% e umidade máxima de 12,5%.

Posteriormente, 3 animais foram sorteados e após jejum médio de 8 horas, tiveram o sangue coletado, sob anestesia, por punção cardíaca, para posteriores análises no plasma, descritas no item 4.4.6. Em seguida, estes animais foram sacrificados.

Os seis animais restantes foram então divididos em dois grupos de três animais cada, que receberam dois diferentes tipos de dietas, conforme descritos a seguir. A composição planejada destas rações se encontra na Tabela 2.

1. Grupo Controle (C): dieta com 20% de óleo de milho;
2. Grupo Hipercolesterolêmico (H): dieta hipercolesterolêmica, com 12% de gordura de côco, 0,1% de colesterol e 8% de óleo de milho;

Tabela 2 - Composição planejada das dietas utilizadas no experimento piloto, representadas em g/kg.

Ingredientes (g/kg)	Controle	Hipercolesterolêmico
Caseína	200	200
Óleo de amaranto	-	-
Óleo de milho	200	80
Gordura de Côco	-	120
Colesterol	-	1
Cloreto de Colina	2	2
Sacarose	100	100
Amido de milho	350	349
Celulose	100	100
L-Cistina	3	3
Mistura Mineral*	35	35
Mistura Vitamínica*	10	10
Total	1000	1000

*Reeves, Nielsen e Tahey (1993)

Depois de 28 dias recebendo estas rações, todos os animais foram submetidos a coletas de sangue e em seguida sacrificados.

O fluxograma representando o desenho do experimento piloto se encontra na Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma representando o desenho do experimento piloto.

4.4.8 Experimento Principal

O experimento principal foi realizado com 46 hamsters. Após 7 dias de adaptação recebendo ração comercial, 6 animais foram sorteados e deixados em jejum médio de 8 horas para coleta de sangue, da mesma maneira que no experimento piloto, para a realização das análises no plasma descritas no item 4.4.6, sendo em seguida sacrificados por exsanguinação.

Os animais restantes foram aleatoriamente divididos em 4 grupos de 10, que receberam diferentes tipos de dietas, conforme descrição a seguir.

1. Grupo Controle (C): dieta com 20% de óleo de milho;
2. Grupo Hipercolesterolêmico (H): dieta hipercolesterolêmica, com 12% de gordura de côco, 0,1% de colesterol e 8% de óleo de milho;
3. Grupo Óleo de Amaranto (A): dieta hipercolesterolêmica, com 12% de gordura de côco, 0,1% de colesterol e 8% de óleo de amaranto;
4. Grupo Esqualeno (E): dieta hipercolesterolêmica, com 12% de gordura de côco, 0,1% de colesterol e 8% de óleo de milho adicionado de 4,6% de esqualeno (mesma quantidade de esqualeno presente no óleo de amaranto).

Os animais receberam estas dietas por um período de 28 dias, e a composição planejada destas se encontra na Tabela 3.

Como pode ser observado, todas as dietas experimentais possuem 20% lipídeos, que é o valor máximo das necessidades nutricionais de hamsters em fase de crescimento (Tabela 1). Optou-se pela utilização deste valor para que uma maior quantidade de óleo de amaranto pudesse ser utilizada (8%).

O grupo controle foi o único que não recebeu a dieta hipercolesterolêmica. Os demais grupos receberam esta dieta, porém o grupo óleo de amaranto (A) recebeu óleo de amaranto em substituição ao óleo de milho e o grupo esqualeno recebeu o óleo de milho, porém adicionado de esqualeno proveniente da Sigma-Aldrich (squalene 3626), na mesma quantidade presente no óleo de amaranto (4,6%).

Tabela 3. Composição planejada das dietas utilizadas no experimento principal, representadas em g/kg.

Ingredientes (g/kg)	Controle	Óleo	Esqualeno	Hipercolesterolêmico
Amaranto				
Caseína	200	200	200	200
Óleo de amaranto	-	80	-	-
Óleo de milho	200	-	-	80
Óleo de milho + Esqualeno	-	-	80	-
Gordura de Côco	-	120	120	120
Colesterol	-	1	1	1
Cloreto de Colina	2	2	2	2
Sacarose	100	100	100	100
Amido de milho	350	349	349	349
Celulose	100	100	100	100
L-Cistina	3	3	3	3
Mistura Mineral*	35	35	35	35
Mistura	10	10	10	10
Vitamínica*				
Total	1000	1000	1000	1000

*Reeves, Nielsen e Tahey (1993)

Após 28 dias consumindo estas rações, todos os animais foram submetidos a coletas de sangue sob anestesia, por punção cardíaca, para a realização das análises descritas no item 4.4.6, sendo em seguida sacrificados por exsanguinação.

O Fluxograma representando o desenho do experimento principal se encontra na Figura 7.

Figura 7 – Fluxograma representando o desenho do experimento principal.

Os procedimentos operacionais, condições climáticas e período do experimento, tanto para o experimento piloto quanto para o experimento principal foram os mesmos descritos nos itens 4.4.1 a 4.4.6.

As análises descritas a seguir são exclusivas do experimento principal.

4.4.9 Análises nas Fezes

As fezes dos animais foram individualmente coletadas nos cinco últimos dias do experimento, sendo os animais alojados em gaiolas especialmente construídas para esta finalidade.

As fezes foram pesadas e acondicionadas em frascos de polietileno, congeladas e liofilizadas por 72 horas. Após secagem, foram pesadas, trituradas e armazenadas a -20°C até realização das análises (FROTA et al., 2008).

4.4.9.1 Colesterol

Alíquotas de 50 mg de fezes foram submetidas à saponificação com 700 μL de metanol e 200 μL de solução de NaOH 5M, por duas horas em banho-maria sob agitação, 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 seca e ressuspensa em 800 μL de hexano grau CLAE. A quantificação foi realizada em equipamento de cromatografia líquida da marca

Shimadzu SCL-10A (*Shimadzu Scientific Instruments-Inc-Japan*), com detector de varredura UV/VIS, injetor manual Rheodyne e bomba quaternária (CSALLANY et al., 1989).

O volume de injeção foi de 20 µL. A fase movel compreendia uma mistura de n-hexano/isopropanol (97:3) com fluxo isocrático de 1 mL/min. e a fase estacionária era composta por Sílica. O comprimento de onda de detecção utilizado foi 206 nm. O tempo de corrida foi de 8 minutos (CSALLANY et al., 1989).

4.4.9.2 Ácidos Biliares

Os ácidos biliares foram quantificados através de um kit comercial da marca Diazyme (San Diego, EUA). Previamente, as fezes foram submetidas à extração com tert-butanol a 50% por 15 minutos a 37 °C e a centrifugação a 10000 g por 2 minutos para obtenção do sobrenadante contendo os ácidos biliares (VAN DER MEER et al., 1985).

4.4.10 Análises no Fígado

4.4.10.1 Colesterol

Para a determinação da concentração hepática de colesterol, foi utilizado o método proposto por Katsanidis e Addis (1999), com algumas modificações.

Amostra de 700 mg de fígado foi homogeneizada em solução de

saponificação. Essa solução consistia de KOH na concentração 11 g/100 mL diluído em etanol 55% (v/v). A amostra foi colocada em banho-maria por 15 minutos a 80 °C. Após resfriamento, foi realizada a partição, sendo selecionada para análise a fase orgânica.

A quantificação do colesterol foi realizada por HPLC em equipamento da marca *Shimadzu SCL-10A (Shimadzu Scientific Instruments-Inc-Japan)*. O volume de injeção foi de 20 µL. A fase móvel foi n-hexano/isopropanol (97:3 v/v), com fluxo isocrático de 1 mL/min. O detector utilizado foi o UV/VIS com varredura, com leitura no comprimento de onda de 206 nm. A quantificação foi realizada utilizando curva de calibração de colesterol padrão da *Sterolids Inc-USA*. O tempo de corrida foi de 8 minutos. As análises foram realizadas em triplicata.

Para avaliar a eficiência do método empregado, foi realizado o teste de recuperação de colesterol, utilizando colesterol padrão. Segundo Leite (1998), a determinação do fator de recuperação do método é importante para garantir que a substância de interesse seja quantificada na sua totalidade. O fator de recuperação ($Fator_{rec}$) foi calculado pelo produto entre a área do pico do padrão puro injetado diretamente no HPLC e a área do pico do padrão processado pelo método de forma equivalente às amostras, segundo a fórmula:

$$Fator_{rec} = \frac{\text{Área do padrão puro}}{\text{Área do padrão processado}} \times 100$$

Esse procedimento resultou em uma recuperação de 85,3%.

4.4.10.2 Análise Histológica

Após sacrifício, os fígados dos animais foram removidos e preservados em formol tamponado 10% por, pelo menos, 48 horas. Em seguida foram realizadas secções transversais destes órgãos.

Os cortes foram submetidos às técnicas histológicas habituais com inclusão em parafina para obtenção de cortes de 5 µm de espessura, corados com hematoxilina-eosina (HE) (FROTA et al., 2008).

A análise histológica foi realizada pela equipe do Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da USP. Para estudo morfométrico, foi utilizado um microscópio óptico comum (Nikon Eclipse E200) ao qual foi acoplado uma câmara fotográfica (Digital color SCC-131 Samsung).

4.4.11 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média, desvio padrão e erro padrão. Para averiguar a diferença de médias entre as variáveis do experimento piloto, foi utilizado o teste T de *Student*.

Para a comparação de médias das variáveis do experimento principal, foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey (quando detectada diferença entre os grupos).

O programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) foi utilizado, sendo as médias consideradas diferentes ao nível de 5% de significância.

4.4.12 Aspectos Éticos

O protocolo experimental do ensaio biológico seguiu as normas do *Canadian Council on Animal Care* (OLFERT; CROSS; MC WILLIAN, 1993). Os procedimentos foram aprovados pelos Comitês de Ética em Animais do Instituto de Medicina Tropical (IMT) e Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP), e pelo Sub-Comitê de Ética Ambiental da Faculdade de Saúde Pública (FSP) da USP (Anexos I , II e III, respectivamente).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO LIPÍDICA

Na Figura 8 temos uma fotografia do óleo de amaranto bruto, obtido por extração com solvente (n-hexano). Dos 90 kg de amaranto submetidos à extração, foram obtidos 3,1 kg de óleo bruto.

Figura 8 – Óleo de amaranto (*Amaranthus cruentus*) bruto, extraído por solvente (n-hexano).

5.2 CARACTERIZAÇÃO CENTESIMAL DA MATÉRIA-PRIMA

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos na análise de composição do amaranto integral e do farelo de amaranto desengordurado.

Tabela 4 – Composição centesimal do amaranto integral (*Amaranthus cruentus* L., BRS-Alegria) e do farelo de amaranto desengordurado, representada em g/100g de matéria-prima, em base seca.

Componente (g/100 g)	Amaranto Integral	Farelo Desengordurado
Cinzas	2,85±0,17 ^a	2,24±0,01 ^a
Proteínas *	15,3±0,33 ^a	14,96±0,88 ^a
Lipídeos	7,45±0,03 ^a	1,40±0,13 ^b
Carboidratos **	74,4	81,40
Total	100	100

Notas:

* Fator de conversão = 6,25

** Calculado pela diferença

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si, teste t de *Sudent* (p<0,05)

Média±desvio-padrão

O teor de óleo do amaranto integral (7,45%) está de acordo com o relatado pela literatura, que é de 5,7-9,0% (SAUNDERS; BECKER, 1984; LYON; BECKER, 1987; GAMEL et al., 2007). Este é um teor de lipídeos elevado quando comparado ao de outros cereais como o milho, que contém 4,5%, e o trigo e arroz, os quais apresentam aproximadamente 2,1% de lipídeos (BELITZ; GROSCH, 1999).

Ao final do processo de extração por solvente, o farelo de amaranto apresentou 1,40% de óleo, o que demonstra a eficiência do processo de extração.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS DE AMARANTO E MILHO

5.3.1 Perfil de Ácidos Graxos

O perfil dos principais ácidos graxos dos óleos de amaranto e milho estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Perfil dos principais ácidos graxos (%) dos óleos de amaranto e milho, utilizados nas dietas dos hamsters.

Ácidos Graxos (%)	Óleo de Amaranto	Óleo de Milho
C14:0 (Mirístico)	0,1	0,0
C16:0 (Palmítico)	15,5	11,4
C16:1 (Palmitoléico)	0,4	0,1
C17:0 (Margarico)	0,1	0,1
C18:0 (Esteárico)	3,3	2,3
C18:1 (Oléico)	31,2	38,4
C18:2 <i>t</i> (Linoléico <i>trans</i>)	0,4	0,3
C18:2 (Linoléico)	32,8	44,6
C20:0 (Araquídico)	0,9	0,7
C20:1 (Eicosenóico)	0,4	0,5
C18:3 (α -Linolênico)	0,5	1,1
C22:0 (Beênico)	0,4	0,2
C20:4 (Aracdônico)	11,7	0,0
C22:2 (Docosadienóico)	0,1	0,0
C24:0 (Lignocérico)	0,5	0,3
C20:5 (Timnodônico)	0,1	0,0
Totais: Saturados	20,8	15,0
Monoinsaturados	32,0	39,0
Poliinsaturados	45,2	45,7
Insaturados	77,2	84,7

Como pode ser observado, os óleos de amaranto e milho apresentam um perfil de ácidos graxos semelhante, sendo os ácidos graxos mais abundantes em ambos o palmítico (C16:0), oléico (C18:1) e linoléico (C18:2). Já o ácido graxo α -linolênico (C18:3) está presente em pequenas quantidades nestes óleos (0,5% no óleo de amaranto e 1,1% no óleo de milho).

Lyon e Becker (1987) e Jahaniaval, Kakuda e Marcone (2000) também verificaram um perfil de ácidos graxos semelhante entre os óleos de amaranto e milho.

Jahaniaval, Kakuda e Marcone (2000) determinaram o perfil de ácidos graxos de 5 variedades distintas de amaranto e encontraram como principais ácidos graxos o

linoléico (34,9-49,1%), oléico (22,8-31,5%) e palmítico (21,4-23,8%). Verificaram também um elevado teor de ácidos graxos insaturados entre as variedades estudadas (71,4-73,2%), valores bem próximos ao apresentado na Tabela 5 (77,2%).

5.3.2 Teor de Esqualeno

Na Tabela 6 se encontram as concentrações de esqualeno dos óleos de amaranto e milho utilizados nas dietas dos animais.

Tabela 6 – Concentração de esqualeno (%) dos óleos de amaranto e milho, utilizados nas dietas dos hamsters.

Óleo	Teor de esqualeno (%)
Amaranto	4,63±0,18
Milho	nd*

* não detectado

Não foi detectada a presença de esqualeno no óleo de milho utilizado neste estudo. Tuberoso et al. (2007) analisaram o conteúdo de esqualeno de diversos óleos vegetais comerciais, dentre eles o de milho, encontrando apenas 0,03% de esqualeno nesse óleo.

De acordo com a literatura, a quantidade de esqualeno em óleos vegetais importantes, como o de oliva, milho e girassol, varia entre 0,01-0,4%, valores que não são suficientes para tornar esses óleos vegetais fontes deste composto (BECKER, 1994).

O conteúdo de esqualeno do óleo de amaranto foi de 4,63% (Tabela 6), o que o torna uma atrativa fonte deste composto isoprenóide. He e Corke (2003) determinaram os conteúdos de esqualeno de 104 genótipos de 30 espécies de amaranto, encontrando uma concentração média de 4,2%, valor bem próximo ao encontrado neste estudo. Becker et al. (1981, 1989) também encontraram 4,6% de esqualeno em óleo de amaranto da espécie *Amaranthus cruentus*.

5.3.3 Conteúdo de Esteróis

Na Tabela 7 encontram-se os teores (mg/100 g) de fitosteróis (campesterol, estigmasterol e β -sitosterol) dos óleos de amaranto e milho.

Tabela 7 – Teores de fitosteróis (campesterol, estigmasterol e β -sitosterol), em mg/100g, dos óleos de amaranto e milho, utilizados nas dietas dos hamsters.

Fitosterol (mg/100 g)	Óleo de amaranto	Óleo de milho
campesterol	13,44 $\pm$ 0,88 ^a	99,52 $\pm$ 2,22 ^b
estigmasterol	17,92 $\pm$ 0,40 ^a	41,58 $\pm$ 1,09 ^b
β -sitosterol	683,40 $\pm$ 19,60 ^a	582,41 $\pm$ 5,42 ^b
Fitosteróis totais *	714,77	723,50

*Fitosteróis totais = campesterol + estigmasterol + β -sitosterol

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si, teste t de *Sudent* (p<0,05)

Os fitosteróis estão naturalmente presentes em vegetais, particularmente em sementes, óleos vegetais, cereais, castanhas, legumes e frutas (NORMÉN et al., 2002). Embora já tenham sido identificados mais de 250 fitosteróis na natureza, os

principais encontrados em alimentos são o campesterol, β -sitosterol, estigmasterol e β -sitostanol (PIIRONEN et al., 2000).

O fitosterol mais abundante em ambos os óleos é o β -sitosterol, sendo o teor deste maior no óleo de amaranto (683,40 mg/100 g) em comparação ao óleo de milho (582,41 mg/100 g) (Tabela 7). Em relação aos outros dois fitosteróis (campesterol e estigmasterol), estes estão presentes em maiores quantidades no óleo de milho (99,52 e 41,58 mg/100 g, respectivamente) em comparação ao óleo de amaranto (13,44 e 17,92 mg/100 g, respectivamente), porém o conteúdo de fitosteróis totais (campesterol + estigmasterol + β -sitosterol) foi similar nesses óleos.

Marcone, Kakuda e Yada (2004) determinaram o conteúdo de fitosteróis de quatro variedades de amaranto e em todas elas o β -sitosterol também foi o mais abundante. Segundo estes autores, o conteúdo deste fitosterol no óleo de amaranto é superior ao encontrado nos óleos de soja, oliva, amendoim, coco e palma.

Almeida e Bragagnolo (2009) determinaram o conteúdo de fitosteróis dos óleos de soja, milho, canola, girassol, azeite de oliva e azeite de oliva extra virgem. Para todas estas matérias-primas, o β -sitosterol foi encontrado em maiores concentrações, enquanto que o estigmasterol apresentou os menores teores. Nesse estudo, o maior teor de fitosteróis totais encontrado foi para o óleo de milho (803,09 mg/100 g), seguido do óleo de canola (646,48 mg/100 g).

5.3.4 Índices de Acidez, Peróxido e Refração

Na Tabela 8 se encontram os resultados das análises dos índices de acidez, peróxido e refração dos óleos de amaranto e milho.

Tabela 8 – Índices de acidez, peróxido e refração dos óleos de amaranto e milho, utilizados nas dietas dos hamsters.

Índice	Óleo de amaranto	Óleo de milho
Acidez (mg KOH/g)	26,90±0,10	0,30±0,00
Peróxido (meq/kg)	17,30±0,00	2,20±0,00
Refração (40 °C)	1,47±0,00	1,47±0,00

Os índices de acidez e peróxido são importantes parâmetros para se determinar a qualidade de óleos e gorduras, uma vez que indicam a presença de rancidez hidrolítica e oxidativa, respectivamente (FERREIRA et al., 2006).

Segundo a ANVISA (2005), o índices de acidez e peróxido de óleos vegetais não refinados não devem ultrapassar 4 mg KOH/g e 15 meq/kg, respectivamente. Portanto, considerando tais parâmetros, o óleo de amaranto bruto utilizado neste estudo deveria ser submetido ao processo de refino antes de ser consumido por seres humanos, procedimento que visa melhorar a aparência, odor e sabor de óleos brutos através da remoção de substâncias como: ácidos graxos livres, fosfolípidos, proteínas, carboidratos, carotenóides, produtos de oxidação e outros componentes (FENNEMA, 2000).

O óleo de milho apresentou índices de acidez e peróxido dentro da faixa de normalidade para óleos vegetais refinados, pois foi utilizado o óleo de milho comercial. Já o índice de refração foi o mesmo para os dois óleos.

5.4 EXPERIMENTO BIOLÓGICO

5.4.1 Modelo Experimental Utilizado

O interesse na utilização dos alimentos funcionais no tratamento da hipercolesterolemia vem crescendo, sendo ratos e hamsters os modelos animais mais utilizados atualmente nas pesquisas envolvendo esse tipo de segmento (CHEN et al., 2008; ZHANG et al., 2009).

A hipercolesterolemia (cerca de 200 mg colesterol/dL plasma) em ratos geralmente é induzida quando estes animais consomem dieta contendo 1% de colesterol (GORINSTEIN et al., 2006; RAMOS et al., 2008), ao passo que se consegue o mesmo grau de hipercolesterolemia em hamsters oferecendo aos mesmos apenas 0,1% de colesterol por meio da dieta (CHAU et al., 2008; CHENG et al., 2008; ZHANG et al., 2009).

Zhang et al. (2009) compararam ratos e hamsters como modelos de hipercolesterolemia e verificaram que estes animais respondem de forma diferente ao colesterol dietético, de forma que os hamsters, assim como os seres humanos, são hiper-responsivos e ratos relativamente hipo-responsivos ao aumento de colesterol. Os autores também observaram que o efeito do colesterol dietético nas lipoproteínas plasmáticas em hamsters é semelhante ao que ocorre em seres humanos, sendo que

este animal carrega aproximadamente 50% do colesterol nas LDL, ao passo que o principal carreador de colesterol em ratos é a HDL.

Assim, considerando o fato de que a hipercolesterolemia é mais facilmente induzida em hamsters do que em ratos e a observação de que o metabolismo lipídico dos hamsters é semelhante ao dos seres humanos, optou-se pela utilização destes animais no presente estudo, pois não há dúvidas de que representam um bom modelo quando se deseja estudar o efeito de alimentos funcionais no abaixamento dos níveis plasmáticos de colesterol (ZHANG et al., 2009).

5.5 EXPERIMENTO PILOTO

O experimento piloto foi realizado para verificar se a dieta do grupo hipercolesterolêmico (contendo 12% de gordura de coco, 8% de óleo de milho e 0,1% de colesterol) seria suficiente para induzir a hipercolesterolemia nos animais deste grupo. Objetivou-se também verificar se os animais do grupo controle (dieta contendo 20% de óleo de milho) manteriam seu perfil lipídico normal, ao contrário dos animais do grupo hipercolesterolêmico, e se ambos os grupos iriam aceitar bem as dietas, de forma a não haver diferença no consumo de ração e ganho de peso entre os grupos.

5.5.1 Composição Centesimal das Rações

Na Tabela 9 se encontra a composição centesimal (base seca) das rações utilizadas nos dois grupos do experimento piloto.

Tabela 9 - Composição centesimal das rações utilizadas nos grupos controle e hipercolesterolêmico, representada em g/100g de dieta, em base seca.

Componente (g/100g)	Controle	Hipercolesterolêmico
Cinzas	2,67±0,01 ^a	2,54±0,07 ^a
Proteínas [*]	19,44±0,63 ^a	19,20±1,05 ^a
Lipídeos	20,91±0,04 ^a	20,26±0,11 ^a
Carboidratos ^{**}	56,98	58,00
Total	100	100

Notas:

^{*}Fator de conversão = 6,25

^{**} Calculado pela diferença

Teste t de *Student*, p<0,05

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si, teste t de *Sudent* (p≥0,05)

Média±desvio padrão

As dietas estavam de acordo com a composição previamente planejada (Tabela 2), de modo que não houve diferença estatisticamente significativa entre os nutrientes das rações ofertadas aos dois grupos experimentais.

Conforme esperado, ambas as rações apresentaram aproximadamente 20% de lipídeos, que é o valor máximo recomendado para hamsters em fase de crescimento. Entretanto, estes lipídeos eram diferentes em relação à qualidade, sendo a ração do grupo controle formulada de modo a manter o perfil lipídico dos animais normal e a do grupo hipercolesterolêmico foi planejada de forma que alterasse o perfil lipídico dos animais, induzindo a hipercolesterolemia.

5.5.2 Consumo de Ração e Peso dos Animais

O consumo total de ração, consumo diário médio, peso inicial e final, ganho de peso e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) estão representados na Tabela 10.

Tabela 10 - Peso inicial, final, ganho de peso, ingestão total de ração, consumo diário médio e coeficiente de eficiência alimentar dos grupos controle e hipercolesterolêmico.

Variáveis	Controle	Hipercolesterolêmico
Peso Inicial (g)	63,93±1,45 ^a	65,48±2,00 ^a
Peso Final (g)	141,05±3,49 ^a	148,46±3,91 ^a
Ingestão total de ração (g)	315,92±15,26 ^a	343,07±9,12 ^a
Consumo diário médio (g)	11,70±0,56 ^a	12,71±0,32 ^a
Ganho de peso (g)	77,13±2,74 ^a	82,98±5,88 ^a
CEA (%)	24,56±1,69 ^a	24,30±2,28 ^a

Notas:

CEA= ganho de peso/ingestão total da dieta multiplicado por 100

Teste t de *Student*, p < 0,05

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si, teste t de *Sudent* (p≥0,05)

Média ± erro padrão

Não houve diferença estatisticamente significativa para todos os parâmetros de consumo avaliados (p > 0,05), bem como para o peso inicial, final e ganho de peso.

A ingestão total de dieta e o consumo diário médio de ambos os grupos foram superiores aos encontrados em outros estudos envolvendo hamsters (FROTA et al., 2008; ISHIMOTO; TORRES, 2008), talvez pelo fato das rações oferecidas aos animais possuírem um teor elevado de lipídeos (20%), sendo provavelmente mais

palatáveis. Consequentemente, o ganho de peso dos animais também foi maior em comparação ao peso dos animais dos estudos citados anteriormente.

5.5.3 Peso do Fígado

Os fígados dos animais foram pesados após sacrifício e o peso relativo calculado considerando-se o peso corporal de cada animal, sendo expresso em g fígado/100g de peso corporal (Figura 9).

Figura 9 – Relação peso do fígado/peso corporal dos animais dos grupos controle e hipercolesterolêmico.

Barras com letras iguais não diferem entre si, teste t de *Student*, $p \geq 0,05$. Nas colunas está representado o erro padrão.

Não foi verificada diferença na relação peso do fígado ajustada pelo peso corporal dos animais do grupo controle (4,73g/100g de peso corporal) e hipercolesterolêmico (4,51g/100g de peso corporal), indicando que o tipo de gordura da dieta não influenciou no peso do fígado dos animais.

5.5.4 Perfil de Lipídeos Plasmáticos

Na Tabela 11 é mostrado o perfil lipídico dos hamsters do grupo basal (cujo sangue foi coletado após 7 dias de consumo da ração comercial, para estabelecimento dos níveis basais) e dos hamsters dos grupos controle e hipercolesterolêmico (que tiveram o sangue coletado após 28 dias de consumo das rações experimentais).

Tabela 11 – Concentração plasmática de colesterol total, HDL-colesterol, colesterol não-HDL e triglicérides dos animais (mg/dL) dos grupos basal, controle e hipercolesterolêmico.

Grupo	Colesterol Total (mg/dL)	Triglicérides (mg/dL)	HDL colesterol (mg/dL)	Colesterol não HDL (mg/dL)*
Basal	75,67±7,33	118,00 ±0,58	36,67±0,33	39,00±4,00
Controle	80,00±4,04 ^a	56,33±3,76 ^a	31,60±4,53 ^a	48,40±1,80 ^a
Hipercolesterolêmico	156,33±8,95 ^b	112,00±3,22 ^b	66,73±10,12 ^b	89,60±2,57 ^b

Notas:

*Colesterol não-HDL = Colesterol Total – HDL colesterol

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa, teste t de *Sudent* (p<0,05) para comparação dos grupos controle e hipercolesterolêmico.

Média ± erro padrão

A concentração plasmática de colesterol total do grupo hipercolesterolêmico foi 95,41% maior em relação ao grupo controle.

O grupo hipercolesterolêmico apresentou uma concentração média de triglicérides 98,83% maior em relação ao grupo controle. É interessante também observar (apesar do grupo basal não ter participado da análise estatística) que o grupo controle apresentou concentração de triglicérides de 56,33 mg/dL, sendo esta

menor que a observada no grupo basal (118 mg/dL), ou seja, o grupo que recebeu apenas a ração comercial durante os 7 dias de adaptação. Isto pode ser explicado pelo fato dos animais do grupo controle terem recebido dieta contendo um elevado teor de óleo de milho (20%), o qual é rico em ácidos graxos monoinsaturados e fitosteróis, relacionados à redução do colesterol e triglicérides no plasma (KROMHOUT, 1999; TRICHOPOULOU, 1997).

O teor total de colesterol para hamsters varia de 38 a 114 mg/dL, a média de HDL é 36 mg/dL e a de LDL é de 26 mg/dL (NISTOR et al., 1987).

Sendo assim, concluiu-se a partir do experimento piloto que a dieta contendo colesterol e gordura saturada (dieta hipercolesterolêmica) foi suficiente para induzir a hipercolesterolemia nos animais, sendo adequada para ser utilizada nos grupos dos animais do experimento principal.

5.6 EXPERIMENTO PRINCIPAL

5.6.1 Composição Centesimal das Rações

Na Tabela 12 estão apresentados os dados de composição centesimal das rações dos quatro grupos do experimento principal (controle, hipercolesterolêmico, óleo de amaranto e esqualeno).

Tabela 12 - Composição centesimal das dietas utilizadas nos grupos do experimento principal (controle, hipercolesterolêmico, óleo de amaranto e esqualeno), representada em g/100g de dieta, em base seca.

Componente (g/100g)	Grupo controle	Grupo hipercolesterolêmico	Grupo óleo de amaranto	Grupo esqualeno
Cinzas	2,67±0,01 ^a	2,54±0,07 ^a	2,20±0,08 ^a	2,46±0,02 ^a
Proteínas [*]	19,44±0,63 ^a	19,20±1,05 ^a	20,12±0,25 ^a	19,05±0,37 ^a
Lipídeos	20,91±0,04 ^a	20,26±0,11 ^a	20,50±0,06 ^a	20,54 ^a ±0,21 ^a
Carboidratos ^{**}	56,98	58,00	57,18	58,05
Total	100	100	100	100

Notas:

^{*}Fator de conversão = 6,25

^{**}Calculado pela diferença

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si, ANOVA, Teste de Tukey (p≥0,05).

Média±desvio padrão

Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os nutrientes dos quatro tipo de rações, estando de acordo com a composição previamente planejada para as dietas do experimento principal (Tabela 3).

5.6.2 Consumo de Rações e Peso dos Animais

Na Tabela 13 se encontram o consumo total de ração, consumo diário médio, peso inicial e final, ganho de peso e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos animais dos grupos controle, hipercolesterolêmico, óleo de amaranto e esqualeno.

Tabela 13 - Peso inicial, final, ganho de peso, ingestão total de ração, consumo diário médio e coeficiente de eficiência alimentar dos hamsters do experimento principal.

Variáveis	C	H	A	E
Peso Inicial (g)	94,10±3,35 ^a	94,81±3,45 ^a	99,65±3,33 ^a	98,56±2,38 ^a
Peso Final (g)	139,74±4,59 ^a	139,00±2,78 ^a	130,84±4,24 ^a	136,92±4,11 ^a
Ingestão total (g)	265,13±6,26 ^a	276,32±9,71 ^a	259,88±6,21 ^a	261,29±8,07 ^a
Consumo diário médio (g)	9,64±0,21 ^a	10,04±0,31 ^a	9,45±0,23 ^a	9,49±0,25 ^a
Ganho de peso (g)	45,64±2,96 ^a	44,19±2,94 ^a	31,20±2,12 ^b	38,36±3,01 ^{ab}
CEA (%)	17,14±0,89 ^a	16,04±1,00 ^a	11,97±0,73 ^b	14,58±0,84 ^{ab}

Notas:

CEA(%) = ganho de peso/ingestão total da dieta multiplicado por 100

Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa, ANOVA, teste de Tukey (p<0,05).

C= controle; H= hipercolesterolêmico; A= óleo de amaranto; E= esqualeno.

Média ± erro padrão

Embora não tenha diferença significativa entre a ingestão total de ração e o consumo diário médio, o ganho de peso dos animais do grupo óleo de amaranto foi menor em relação aos dos grupos controle e hipercolesterolêmico, porém não se diferiu do grupo esqualeno. Este resultado refletiu no CEA dos animais que consumiram óleo de amaranto, que também foi menor em relação aos grupos controle e hipercolesterolêmico, não se diferenciando do grupo esqualeno.

Berger et al. (2003a) também verificaram um menor ganho de peso no grupo de hamsters que receberam óleo de amaranto, também extraído por solvente orgânico, em comparação ao grupo controle, e levantaram a hipótese deste fato estar associado à possível presença de ceras e alguns pigmentos no óleo de amaranto bruto, os quais só podem ser removidos pelo processo de refino. Segundo os autores, estas substâncias podem ter ocasionado uma menor digestibilidade do

óleo de amaranto em relação ao óleo de milho comercial que foi utilizado na ração dos animais do grupo controle.

Apesar disso, o menor valor de CEA e menor ganho de peso encontrados no grupo óleo de amaranto não é preocupante para este estudo, pois de acordo com Yadav e Liener (1977), parece não haver nenhuma relação entre a resposta de crescimento devido à dieta e sua habilidade em influenciar as concentrações plasmáticas de colesterol. Além disso, embora tenha havido menor ganho de peso dos animais do grupo óleo de amaranto, não houve perda de peso dos mesmos, que se mostraram saudáveis durante todo o experimento, de acordo com parâmetros de normalidade avaliados periodicamente, como olhos brilhantes, pelos macios e sem falhas, reflexos rápidos e ausência de diarreia ou mudanças no comportamento.

5.6.3 Peso do Fígado

Na Figura 10 está apresentada a relação peso do fígado pelo peso corporal dos animais (g fígado/100g de peso corporal) dos grupos controle, hipercolesterolêmico, óleo de amaranto e esqualeno.

Figura 10 – Relação peso do fígado/peso corporal dos animais dos grupos controle, hipercolesterolêmico, óleo de amaranto e esqualeno.

Barras com letras diferentes diferem entre si, ANOVA, teste de Tukey ($p < 0,05$). Nas colunas está representado o erro padrão.

Não foi verificada diferença na relação peso do fígado ajustada pelo peso corporal dos animais do grupo hipercolesterolêmico (5,01 g/100g de peso corporal), óleo de amaranto (5,09 g/100g de peso corporal) e esqualeno (5,25 g/100g de peso corporal).

No experimento piloto, não foi verificada diferença entre o peso relativo do fígado dos animais dos grupos controle e hipercolesterolêmico (Figura 9). Entretanto, no experimento principal a relação peso do fígado ajustada pelo peso corporal obtida para o grupo controle (4,14g/100g de peso corporal) se diferenciou dos demais grupos (Figura 10), que receberam a dieta hipercolesterolêmica, indicando que nesse caso o tipo de gordura influenciou o peso do fígado dos animais.

5.6.4 Perfil de Lipídeos Plasmáticos

Em estudos de metabolismo lipídico, na maioria dos trabalhos os animais são submetidos a jejum de 12-16 horas antes da coleta de sangue. Entretanto, a necessidade de jejum prévio à coleta de sangue, quando se deseja avaliar o perfil de lipídeos plasmáticos, ainda é controversa.

Em se tratando de hamsters, a discussão é ainda maior, pois estes animais possuem uma “bolsa interna” na cavidade oral, onde costumam esconder parte da ração ofertada. Alguns autores, quando submetem estes animais ao jejum, retiram as rações que se encontram nas bolsas, porém dependendo da forma como é feito este procedimento, pode-se gerar estresse nos animais, interferindo nos parâmetros observados.

Weingand e Daggy (1991), buscando respostas sobre a necessidade de jejum prévio à coleta de sangue para análise de lipoproteínas plasmáticas em hamsters, não verificaram diferenças nas concentrações de colesterol total entre animais que foram submetidos a um jejum de 18 horas e aos que não foram submetidos ao jejum. Segundo Waner e Nyska (1994), o jejum por um período inferior a 8 horas também não afeta as concentrações plasmáticas de lipoproteínas e triglicérides em ratos.

Por outro lado, em algumas pesquisas verificou-se que a modificação do metabolismo em resposta a longo período de jejum levaria a uma redução significativa dos genes envolvidos no metabolismo do colesterol (WANER; NYSKA, 1994; HORTON et al., 1998; STANGL et al., 2007).

Diante do exposto, com o intuito de privar os animais de um jejum prolongado como os que rotineiramente são utilizados, decidiu-se submeter os animais a um jejum médio de 8 horas.

Na Tabela 14 é apresentada a concentração plasmática de colesterol total, HDL colesterol, triglicérides e colesterol não-HDL (VLDL + LDL colesterol) dos animais dos grupos basal (cujo sangue foi coletado após 7 dias de consumo da ração comercial), controle, hipercolesterolêmico, óleo de amaranto e esqualeno (os quais tiveram o sangue coletado após 28 dias de consumo das rações experimentais).

Tabela 14 - Perfil lipídico dos hamsters do grupo basal e dos hamsters após 28 dias alimentando com as dietas do experimento principal.

Grupo	Colesterol Total (mg/dL)	Triglicérides (mg/dL)	HDL colesterol (mg/dL)	Colesterol não HDL (mg/dL)*
Basal	72,67±7,14	87,00 ±12,06	23,50±4,31	49,17±4,71
Controle	92,50±6,86 ^a	72,70±4,43 ^a	37,60±2,12 ^a	54,90±5,38 ^a
Hipercolesterolêmico	147,00±12,58 ^b	112,00±7,00 ^b	50,50±4,12 ^{ab}	96,50±9,02 ^{ab}
Óleo de amaranto	172,00±19,45 ^b	121,90±9,48 ^b	53,40±4,64 ^b	118,60±17,07 ^b
Esqualeno	177,10±15,24 ^b	111,70±5,46 ^b	58,20±3,52 ^b	118,90±12,27 ^b

Notas:

*Colesterol não- HDL (VLDL+LDL) = Colesterol Total – HDL colesterol

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa, ANOVA, teste de Tukey (p<0,05), para comparação dos grupos controle, hipercolesterolêmico, óleo de amaranto e esqualeno.

Média ± erro padrão

Verificou-se um aumento das concentrações plasmáticas de colesterol total (CT) dos animais dos grupos óleo de amaranto e esqualeno em relação aos do grupo hipercolesterolêmico, porém este aumento não foi estatisticamente significativo. Como já se esperava, os valores de CT destes três grupos foram

superiores e diferiram estatisticamente ao do grupo controle, que não recebeu a dieta hipercolesterolêmica.

A concentração dos triglicérides foi a mesma para os grupos hipercolesterolêmico, óleo de amaranto e esqualeno, sendo os três superiores à verificada nos animais do grupo controle. O mesmo foi observado para o HDL-c, com os grupos óleo de amaranto, esqualeno e hipercolesterolêmico apresentando concentrações semelhantes.

Sendo assim, o óleo de amaranto e o esqualeno, nas concentrações utilizadas no presente estudo, não apresentaram efeito hipocolesterolemizante, sendo que para todos os parâmetros plasmáticos avaliados os grupos hipercolesterolêmico, óleo de amaranto e esqualeno obtiveram os mesmos resultados e não diferem estatisticamente entre si.

Berger et al. (2003a) administraram óleo de amaranto (*Amaranthus cruentus*), extraído por solvente, em hamsters nas concentrações de 2,5% e 5,0%, juntamente com a dieta hipercolesterolêmica. Não foi observada redução do colesterol plasmático no grupo dos animais que receberam 2,5% de óleo de amaranto em relação do grupo controle (que recebeu 2,5% de óleo de milho comercial). Porém, nos animais do grupo que recebeu 5% de óleo de amaranto foi observada redução de 15% do colesterol total e 22% do colesterol não-HDL, em relação ao grupo controle (que recebeu 5% de óleo de milho). Neste estudo, os animais também receberam gordura de coco (14%) e colesterol (0,12%) juntamente com os óleos vegetais, por quatro semanas. Os autores concluíram que o efeito hipocolesterolêmico do óleo de amaranto é verificado quando uma maior

quantidade de óleo é administrada. No entanto, este efeito não foi verificado no presente estudo, quando foram oferecidos 8% de óleo de amaranto aos animais.

Em outro estudo, Berger et al. (2003b) ofereceram por quatro semanas, 4,5% de óleo de amaranto (*Amaranthus cruentus*) cru e refinado (em grupos distintos) a hamsters, juntamente com 11% de óleo de coco e ,05% de colesterol, e compararam o perfil de lipídeos plasmáticos destes animais com o dos animais do grupos controle (que receberam óleo de milho em substituição ao óleo de amaranto), não verificando qualquer mudança nas concentrações de colesterol total, triglicérides, HDL-colesterol e colesterol não-HDL.

Plate e Arêas (2002) ofereceram 2% de óleo de amaranto (*Amaranthus caudatus*) a coelhos hipercolesterolemizados e não verificaram redução do colesterol total em relação ao grupo controle (que recebeu 2% de óleo de girassol), porém as concentrações de triglicérides foram menores nos animais do grupo óleo de amaranto em relação ao grupo controle.

Os resultados também são controversos em relação ao efeito do esqualeno. No presente estudo, não foi verificada diferença entre o perfil lipídico dos animais do grupo hipercolesterolêmico (que receberam óleo de milho) e esqualeno (que receberam óleo de milho adicionado de esqualeno) (Tabela 13). Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Strandberg et al. (1989) e Strandberg et al. (1990), que não verificaram mudanças no colesterol sérico de ratos e humanos, respectivamente, após o consumo de esqualeno.

Smith et al. (2000) avaliaram o efeito de uma dieta com teores elevados de gordura saturada (10%) e colesterol (0,05%) suplementada de β -sitosterol ou esqualeno, no perfil de lipoproteínas plasmáticas de hamsters, durante quatro

semanas. No grupo dos animais que receberam dieta suplementada de β -sitosterol foi verificada uma diminuição do colesterol total e triglicérides em 33% e 49%, respectivamente. Entretanto, no grupo dos animais que receberam dieta suplementada de esqualeno, não foi verificada diferença no perfil de lipoproteínas plasmáticas em relação ao grupo controle, que não recebeu a suplementação.

Por outro lado, Zhang et al. (2002) suplementaram a dieta de hamsters com esqualeno nas doses de 0,05%, 0,1% e 0,5% do total da dieta e observaram um aumento de 32% do colesterol total quando foi oferecido 0,05%; 23% quando os animais consumiram 0,1% e 35% após a administração de 0,5% de esqualeno, em relação ao grupo controle. No presente trabalho, o esqualeno representou 0,4% da dieta nos grupos óleo de amaranto e esqualeno e o aumento do colesterol total observado em relação ao grupo hipercolesterolêmico foi ao redor de 19%, embora este aumento não tenha sido estatisticamente significativo. Scolastici, Ong e Moreno (2004) também observaram elevação do colesterol total quando doses de 100 ou 150 mg de esqualeno/100g de peso corporal foram administradas a ratos Wistar por 8 semanas consecutivas.

Assim, diversos estudos, incluindo este, concluíram que o esqualeno, bem como o óleo de amaranto, não são capazes de reduzir as concentrações de lipídeos plasmáticos em modelos animais.

5.6.5 Teores de Ácidos Biliares e Colesterol nas Fezes

Os teores de ácidos biliares e colesterol excretados nas fezes dos animais se encontram na Tabela 15.

Tabela 15 – Excreção fecal de ácidos biliares e colesterol dos hamsters dos grupos controle, hipercolesterolêmico, óleo de amaranto e esqualeno.

Grupo	Ácidos biliares ($\mu\text{mol/g}$ de fezes)	Colesterol ($\text{g}/100\text{g}$ de fezes)
Controle	$1,30 \pm 0,10^a$	$0,61 \pm 0,01^a$
Hipercolesterolêmico	$1,58 \pm 0,11^a$	$0,61 \pm 0,04^a$
Óleo de amaranto	$2,24 \pm 0,17^b$	$0,57 \pm 0,10^a$
Esqualeno	$2,23 \pm 0,08^b$	$0,39 \pm 0,12^a$

Dados expressos como média $\pm$ erro padrão de 3 determinações. Letras diferentes na mesma coluna indicam que as médias diferem entre si, ANOVA, Tukey ($p < 0,05$).

Não foi verificada diferença estatisticamente significativa na excreção fecal de colesterol entre os grupos, e até mesmo o grupo controle, que não recebeu a dieta hipercolesterolêmica, apresentou a mesma excreção fecal de colesterol que os grupos que receberam esta dieta.

Observou-se um aumento da excreção fecal de ácidos biliares nos grupos óleo de amaranto e esqualeno em relação aos grupos controle e hipercolesterolêmico.

Tilvis e Miettinen (1983a) também observaram aumento na excreção de ácidos biliares quando ratos foram alimentados com dieta contendo 1% de esqualeno.

Em outro estudo, estes mesmos autores verificaram que o intestino dos ratos

apresenta uma marcada capacidade de absorção do esqualeno dietético e que o esqualeno absorvido é preferencialmente convertido em ácidos biliares no fígado (TILVIS; MIETTINEN; 1983b).

Nakamura et al (1997) também verificaram aumento na excreção de ácidos biliares quando ratos foram submetidos à administração oral crônica de esqualeno, concluindo que uma quantidade considerável de esqualeno é absorvida pelo intestino, e nos hepatócitos parte deste esqualeno é metabolizada a ácidos biliares via colesterol, sendo então excretados nas fezes.

Em humanos, Strandberg, Tilvis e Miettinen (1990) verificaram aumento na excreção de colesterol e ácidos biliares após o consumo de esqualeno. Neste estudo, não foi verificado aumento do colesterol sérico provavelmente devido aos mecanismos compensatórios como a inibição da atividade das enzimas HMG-CoA redutase e acil-coenzima-A: colesterol aciltransferase (ACAT), e aumento da excreção fecal de esteróis.

Segundo Strandberg, Tilvis e Miettinen (1989), quando há o consumo de esqualeno dietético, a síntese de colesterol aumenta, e o organismo se encarrega de eliminá-lo, de forma que as concentrações séricas de colesterol não se alterem, favorecendo a homeostase lipídica. Tal fato pôde ser constatado no presente estudo, em que as concentrações plasmáticas de colesterol não se alteraram significativamente, porém, a excreção fecal de ácidos biliares nos grupos óleo de amaranço e esqualeno aumentou.

5.6.6 Análises no Fígado

5.6.6.1 Colesterol

Na Tabela 16 são apresentados os resultados dos teores de colesterol hepático dos animais dos grupos controle, hipercolesterolêmico, óleo de amaranto e esqualeno.

Tabela 16 – Colesterol do fígado dos animais dos grupos controle, hipercolesterolêmico, óleo de amaranto e esqualeno.

Grupo	Colesterol (g/100g de fígado)
Controle	0,20±0,01 ^a
Hipercolesterolêmico	0,22±0,01 ^{ab}
Óleo de amaranto	0,22±0,02 ^{ab}
Esqualeno	0,28±0,02 ^b

Dados expressos como média±erro padrão de 3 determinações. Letras diferentes na mesma coluna indicam que as médias diferem entre si, ANOVA, Tukey (p< 0,05).

De acordo com a Tabela 16 observou-se diferença significativa entre os grupos controle e esqualeno, corroborando com as afirmativas de aumento de síntese de colesterol provocada pelo esqualeno. Não houve diferença significativa no conteúdo de colesterol no fígado dos animais dos grupos hipercolesterolêmico, óleo de amaranto e esqualeno, embora a quantidade média de colesterol do grupo esqualeno tenha sido o maior dentre todos (0,28g/100g fígado). O grupo controle foi o que apresentou o menor teor de colesterol hepático (0,20g/100g de fígado), porém

também não se diferenciou estatisticamente dos valores encontrados nos grupos hipercolesterolêmico e óleo de amaranto.

Embora no presente estudo não tenha sido verificado maior acúmulo de colesterol no fígado dos animais dos grupos óleo de amaranto e esqualeno em relação aos animais do grupo hipercolesterolêmico (cujas dietas não continham esqualeno), existem vários estudos que observaram maior acúmulo de colesterol hepático relacionado ao consumo do esqualeno.

Khor e Chieng (1997) observaram redução dos níveis plasmáticos de colesterol total de hamsters alimentados com dieta contendo 0,1% de esqualeno e atribuíram esta redução ao acúmulo de ésteres de colesterol no fígado. De forma análoga, Channon et al. (1926, 1937) verificaram maiores conteúdos de colesterol e ésteres de colesterol no fígado de ratos alimentados com dieta suplementada de esqualeno e Kritchevsky et al. (1954) observaram um maior acúmulo de ésteres de colesterol no fígado de coelhos alimentados com dieta suplementada de esqualeno, porém nesses animais não foram observados maiores níveis de aterosclerose.

Zhang et al. (2002) também observaram maior teor de colesterol no fígado de hamsters alimentados com dieta contendo 0,05%, 0,1% e 0,5% de esqualeno em relação ao grupo controle. Os autores atribuíram este aumento à conversão do esqualeno em colesterol no fígado, fato que foi observado em outros estudos (TILVIS; MIETTINEN, 1983a; STRANDBERG; TILVIS; MIETTINEN, 1989; RELAS et al., 2000), e que possivelmente também tenha acontecido neste.

Strandberg, Tilvis e Miettinen (1989), utilizando ratos como modelo experimental, demonstraram que o consumo de esqualeno promoveu um estímulo da

atividade da enzima hepática ACAT, possivelmente causando um acúmulo de colesterol esterificado no fígado e reduzindo sua liberação no sangue.

5.6.6.2 Análise Histológica

Quando as células acumulam mais ácidos graxos livres do que o requerido para os processos anabólicos e catabólicos, o excesso de lipídeos é esterificado e armazenado como triglicérides nas partículas de gordura. Os adipócitos possuem uma capacidade única de estocar grandes quantidades de ácidos graxos livres nas partículas de gordura citosólica. Entretanto, células de tecidos diferentes do adiposo possuem uma capacidade limitada de armazenar lipídeos. Quando esta capacidade é excedida, ocorre disfunção celular ou morte celular, processo conhecido como lipotoxicidade (SHAFFER, 2003).

A esteatose hepática representa um acúmulo excessivo de lipídeos (triglicérides) nas células parenquimatosas hepáticas (hepatócitos), e isto ocorre em diversas condições etiológicas. Morfologicamente, a esteatose hepática se manifesta como o acúmulo de gotículas de gordura grandes (macrovesicular) ou pequenas (microvesicular) nas células parenquimais do fígado (REDDY; RAO, 2006).

A esteatose é uma das manifestações da doença hepática gordurosa não alcoólica. É considerada benigna e reversível, no entanto, quando crônica, pode estar associada à inflamação, condição conhecida como esteato-hepatite. Nesta última condição, o fígado sofre diversos danos que podem levar à fibrose, cirrose e câncer hepático (WOUTERS et al., 2008).

No presente estudo, a avaliação histológica do fígado incluiu a análise semi-quantitativa da presença de gordura micro e macro-vesical. O grau de inflamação também foi avaliado, sendo a inflamação dividida em dois tipos: portal e parenquimatosa. Para isto, as lâminas foram codificadas e analisadas por um patologista sem conhecimento prévio dos tratamentos aos quais os animais haviam sido submetidos.

O grau de esteatose hepática foi graduado em uma escala de 0 a 4+, de acordo com Frota et al. (2008), cuja classificação é descrita na Tabela 17.

Tabela 17 – Escores de esteatose hepática e respectivos significados clínicos.

Escore	Significado clínico
0	ausência de esteatose
1+	esteatose focal (em menos de 50% das veias centro-lobulares)
2+	esteatose em mais de 50% das veias centro lobulares
3+	esteatose difusa
4+	esteatose difusa e intensa

A inflamação (parenquimatosa e portal) foi classificada de acordo com Brunt et al. (1999) e os escores de inflamação adotados são descritos na Tabela 18.

Tabela 18 – Escores de inflamação (parenquimatosa e portal) e respectivos significados clínicos.

Escore	Parenquimatosa	Portal
0	Ausência de inflamação	Ausência de inflamação
1+	<2 focos por campo de 20 ×	Inflamação leve
2+	2–4 focos por campo de 20 ×	Inflamação moderada
3+	>4 focos por campo de 20 ×	Inflamação marcada

Os hamsters dos grupos controle e esqualeno apresentaram em média escore +1 e +2 para o grau de esteatose, respectivamente, enquanto o grupo óleo de amarantho apresentou em média escore +3, sendo este último o maior grau de esteatose observado (Figura 11). Surpreendentemente, apenas um animal do grupo hipercolesterolêmico apresentou esteatose hepática, obtendo o grupo escore próximo de 0 para o grau de esteatose.

Figura 11 – Esteatose hepática média dos hamsters dos grupos controle, hipercolesterolêmico, óleo de amarantho e esqualeno.

Barras com letras diferentes diferem entre si, ANOVA, teste de Tukey ($p < 0,05$). Nas colunas está representado o erro padrão.

Não houve diferença significativa entre o grau de inflamação portal entre os grupos, sendo que todos receberam em média escore 0, pois apenas alguns animais apresentaram este tipo de inflamação. A inflamação portal é caracterizada, na maioria das vezes, por infiltrados inflamatórios crônicos (TINIAKOS; VOS;

BRUNT, 2010). Talvez o tempo do estudo (28 dias) não tenha sido suficiente para a maioria dos animais desenvolverem este tipo de inflamação.

A inflamação parenquimatosa, geralmente leve, consiste em pequenos focos de infiltrados de células inflamatórias compostos por linfócitos, eosinófilos, e ocasionalmente leucócitos polimorfonucleares. Além disso, agregados de células de Kupffer (microgranulomas) e lipogranulomas podem ser observados nos lóbulos (TINIAKOS; VOS; BRUNT, 2010). O único grupo em que nenhum animal desenvolveu este tipo de inflamação foi o grupo hipercolesterolêmico. Os demais grupos (controle, óleo de amaranto e esqualeno) receberam em média escore 1+, caracterizando uma inflamação discreta.

A Figura 12 representa a deposição de gordura hepática em hamster do grupo controle, grupo que embora não tenha recebido dieta hipercolesterolêmica (contendo gordura saturada e colesterol), apresentou em média esteatose focal (grau 1+).

Figura 12 – Fotomicrografia de secções de 5 µm de espessura do fígado coradas com HE, ilustrando o acúmulo de gordura hepática focal, em hamster do grupo controle.

A Figura 13 ilustra a ausência de esteatose e inflamação hepática em hamster do grupo hipercolesterolêmico.

Figura 13 – Fotomicrografia de secções de 5 μ m de espessura do fígado coradas com HE, ilustrando ausência de esteatose e inflamação hepática, em hamster do grupo hipercolesterolêmico.

Sabe-se que a lipotoxicidade direta dos ácidos graxos não esterificados ou ácidos graxos livres (AGL) é tida como progressora da esteatose hepática não alcoólica (SCHAFFER, 2003). A lipotoxicidade também pode ser relacionada com os ácidos graxos de cadeia longa, como o ácido palmítico (SCHAFFER, 2003; FELDSTEIN et al., 2004; FARREL; LARTER, 2006).

Em geral, ácidos graxos livres monoinsaturados são considerados menos citotóxicos, e há indícios de que protegem contra a lipoapoptose induzida pelos ácidos graxos livres saturados em algumas células (EITEL et al., 2002). Sendo assim, o grupo controle (que recebeu 20% de óleo de milho) deveria ter sido o grupo

caracterizado pelo menor grau de esteatose e inflamação dentre os demais grupos (que receberam gordura saturada e colesterol). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado associação entre o consumo de ácidos graxos poliinsaturados e esteatose hepática (NANJI et al., 2001; NANJI, 2004; RONIS et al., 2004; YOU et al., 2005; BAUMGARDNER et al., 2008).

Baumgardner et al. (2008) publicaram um novo modelo para o desenvolvimento de esteatose hepática em ratos, resultado da ingestão de óleo de milho como fonte de gordura, o qual é composto principalmente de ácidos graxos poliinsaturados.

No modelo da doença hepática alcóolica, o qual apresenta patologia similar à esteatose hepática não alcoólica, alguns estudos demonstraram progressão da patologia associada à ingestão de ácidos graxos poliinsaturados ou n-3 proveniente do óleo de peixe. Em contrapartida, observou-se que os ácidos graxos saturados de cadeia curta e longa apresentaram efeito protetor (NANJI et al., 2001; NANJI, 2004; RONIS et al., 2004; YOU et al., 2005).

Ronis et al. (2004), por meio de um modelo de hepatotoxicidade induzida pelo álcool, verificaram menores concentrações de triglicérides e ácidos graxos livres nos ratos alimentados com 30% de gordura saturada em relação àqueles que consumiram óleo de milho (30%) como fonte de gordura. Neste estudo, não foi verificada presença de esteatose em nenhum animal do grupo que recebeu gordura saturada. Assim, considerando o fato de que a hepatoesteatose é ocasionada principalmente pelo acúmulo de triglicérides no fígado, a diminuição da síntese de ácidos graxos e aumento de sua degradação poderiam, segundo os autores, ter contribuído para a ausência de esteatose no grupo alimentado com gordura saturada.

Outra explicação para o maior acúmulo de gordura no fígado dos animais do grupo controle em relação aos do grupo hipercolesterolêmico pode ser o fato da gordura insaturada ser mais bem absorvida do que a gordura saturada, como verificou Portillo et al. (2001) e Rodríguez et al. (2001), em estudos utilizando ratos.

O fato é que os grupos óleo de amaranto e esqualeno, que também receberam a dieta hipercolesterolêmica, apresentaram maior grau de esteatose e inflamação do que o grupo hipercolesterolêmico, evidenciando que o óleo de amaranto e o esqualeno tiveram algum papel no acúmulo de gordura hepática dos animais.

As Figuras 14 e 15 representam, respectivamente, a esteatose e inflamação parenquimatosa em hamster do grupo óleo de amaranto. Já as Figuras 16 e 17 apresentam, respectivamente, a esteatose e inflamação parenquimatosa em hamster do grupo esqualeno.

Figura 14 – Fotomicrografia de secções de 5 µm de espessura do fígado coradas com HE, ilustrando o acúmulo de gordura hepática difusa (grau 3+), em hamster do grupo óleo de amaranto.

Figura 15 – Fotomicrografia de secções de 5 μ m de espessura do fígado coradas com HE, ilustrando a inflamação parenquimatosa grau 1+, em hamster do grupo óleo de amaranto.

Figura 16 – Fotomicrografia de secções de 5 μ m de espessura do fígado coradas com HE, ilustrando a esteatose grau 2+, em hamster do grupo esqualeno.

Figura 17 – Fotomicrografia de secções de 5 µm de espessura do fígado coradas com HE, ilustrando a inflamação parenquimatosa grau 1+, em hamster do grupo esqualeno.

Comparando o grau de esteatose e inflamação dos grupos óleo de amaranto e esqualeno, verifica-se que o acúmulo de gordura e a inflamação foram mais pronunciados no fígado dos animais do grupo óleo de amaranto. Uma vez que os animais de ambos os grupos foram alimentados com a mesma quantidade de esqualeno, uma possível explicação para esta diferença histológica pode ser o fato do óleo de amaranto não ter sido submetido ao processo de refino. Esta é uma etapa fundamental para a remoção de ácidos graxos livres e substâncias como ceras, em óleos comestíveis.

O alto índice de acidez (Tabela 8) encontrado para o óleo de amaranto sugere a presença de grandes quantidades de ácidos graxos livres neste óleo. Segundo Lupi et al. (2002), o acúmulo destes em tecidos diferentes do adiposo, podem promover danos celulares e apoptose, em um processo conhecido como lipotoxicidade. De fato, o processo de apoptose pôde ser observado no tecido hepático de alguns animais do grupo óleo de amaranto, como é demonstrado na Figura 18. O refino do óleo de

amaranto e a consequente redução desta alta acidez torna-se uma etapa essencial para a comercialização deste óleo.

Figura 18 – Fotomicrografia de secções de 5 μm de espessura do fígado coradas com HE, ilustrando o processo de apoptose (seta), em hamster do grupo óleo de amaranto.

6 CONCLUSÕES

- Conclui-se através deste estudo que o óleo de amaranto e o esqualeno não apresentam efeito hipocolesterolemizante em hamsters alimentados com dieta contendo elevadas quantidades de colesterol e gordura saturada.
- Tanto o consumo do óleo de amaranto quanto do esqualeno promoveram um aumento da excreção fecal de ácidos biliares dos hamsters.
- Os maiores graus de esteatose e inflamação parenquimatosa hepática foram verificados nos animais alimentados com óleo de amaranto e esqualeno, o que sugere que o esqualeno exerce um papel na deposição de lipídeos hepáticos dos animais, embora esse efeito ainda não esteja claro.
- Finalmente, o efeito hipocolesterolemizante do grão de amaranto parece não depender de sua fração lipídica, informação que corrobora com os achados que sugerem que a proteína é a fração majoritariamente responsável por tal efeito.

7 REFERÊNCIAS

- Almeida CAS, Bragagnolo N. Avaliação dos principais fitosteróis em óleos vegetais e azeites [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos; 2009.
- Alvarez-Leite JI, Peluzio MCG. Lípidos. In: Nutrição Clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. p. 7-19.
- Alvarez-Leite JI, Oliveira DR, Peluzio MCG. Dislipidemias. In: Nutrição Clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. p. 196-211.
- Amaya-Farfan J, Marcílio R, Spehar CR. Deveria o Brasil investir em novos grãos para a sua alimentação? A proposta do amaranto (*Amaranthus* sp.). Seg Alim Nutr. 2005; 12: 47-56.
- American Heart Association. Heart and stroke statistical update. Dallas: American Heart Association; 2002.
- American Oil Chemical Society (AOCS). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists's Society. 5 ed. Champaign; 2003.
- Anjo DFC. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. J Vasc Bras. 2004; 3(2): 145-154.
- Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 18, de 30 de abril de 1999.
- Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RES nº 270, de 22 de setembro de 2005.
- Ascheri JLR, Carvalho CWP, Spehar CR. Extrusão do amaranto no desenvolvimento de produtos: caracterização físico-química. Ministério de Agricultura, pecuária e abastecimento. Rio de Janeiro; 2004.
- Assis-Vaz, LCM, Arêas JAG. Efeito da ingestão de proteína de amaranto no metabolismo do colesterol em ratos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública; 2010.

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis. 17 ed. Gaithersburg; 2003.
- Barreto SM, Pinheiro ARO, Sichieri R, Monteiro CA, Batista Filho M, Shimidt M. Análise da estratégia global para alimentação, atividade física e saúde da Organização Mundial da Saúde. *Epidemiol Serv Saúde*. 2005; 14(1): 41-68.
- Bastos DHM, Rogero MM, Arêas JAG. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009; 53(5): 646-656.
- Baumgardner JN, Shankar K, Hennings L, Badger TM, Ronis MJJ. A new model for nonalcoholic steatohepatitis in the rat utilizing total enteral nutrition to overfeed a high-poliunsaturated fat diet. *Am J Physiol Liver Physiol*. 2008; 294: G27:G38.
- Becker R, Wheeler EL, Lorenz K, Stafford AE, Grasjean OK, Betschart AA, Saunders RM. A compositional study of Amaranth grain. *J Food Sci*. 1981; 46(4): 1175-1180.
- Becker R. Preparation, composition and nutritional implications of amaranth seed oil. *Cereal Foods World*. 1989; 34(11): 950-953.
- Becker R. Amaranth oil: composition, processing, and nutritional qualities. In: *Amaranth Biology, Chemistry, and Technology*; Paredes-Lopez, O., Ed.; CRC Press: Boca Raton; 1994. p. 133-144.
- Belitz HD, Grosch W. *Food Chemistry*. 2 Ed, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany; 1999. p. 631-692.
- Berganza BE, Moran AW, Rodrigues MG, Coto NM, Santamaria M, Bressani R. Effect of variety and location on the total fat, fatty acids and squalene content of amaranth. *Plant Foods Human Nutr*. 2003; 58(3): 1-6.
- Berger et al. 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, Gummy D, Hayes KC, Lambelet P. Cholesterol-lowering properties of amaranth flakes, crude and refined oils in hamsters. *Food Chem*. 2003b; 81:119-124.

- Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, et al. Atherosclerosis: basis mechanisms. *Circulation*. 1995; 91: 2488-2496.
- Breene WM. Food uses of grain amaranth. *Cereal Food World*. 1991; 36(5):426-430.
- Bressani R. Calidad proteínica de lasemilla de amaranto cruda e procesada. In: El amaranto y su potencial. Archivos Latinoamericanos de Nutrición: Guatemala; 1983.
- Brown AJ, Jessup W. Oxysterols: sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Mol Aspects Med*. 2009; 30: 111-122.
- Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*. 1999; 94:2467-74.
- Bucher NLR, Overath P, Lynen F. β -Hidroxi- β -methylglutaryl coenzyme A reductase, cleavage and condensing enzymes in relation to cholesterol formation in rat liver. *Biochim Biophysic Acta*. 1960; 40: 491-501.
- Champe PC, Harvey RA. *Bioquímica Ilustrada*. 2 ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 2002. 446p.
- Chan P, Tomlison B, Lee CB, Lee YS. Effectiveness and safety of low-dose pravastatin and squalene, alone and in combination, in elderly patients with hypercholesterolemia. *J Clin Pharmacol*. 1996; 36: 422-427.
- Channon HJ. Biological significance of the unsaponifiable matters of oils. 1. Experiments with the unsaturated hydrocarbon, squalene (Spinacene). *Biochem J*. 1926; 20: 400-408.
- Channon HJ, Tristram GR. The effect of the administration of squalene and other hydrocarbons on cholesterol metabolism in the rat. *Biochem J*. 1937; 31: 738-47.
- Chatuverdi A, Sarojini G, Devi NL. Hypocholesterolemic effect of amaranth seeds (*Amaranthus esculantus*). *Plant Foods Hum Nutr*. 1993; 44(1): 63-70.

- Chávez-Jáuregui RN, Silva MEMP, Arêas JAG. Optimization of extrusion cooking process for amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) by response surface methodology. J Food Sci. 2000; 65(6): 1009-1015.
- Chau CF, Yang P, Yu CM, Yen GC. Investigation on the lipid-and cholesterol-lowering abilities of biocellulose. J Agric Food Chem. 2008; 56: 2291-2295.
- Chen ZY, Jiao R, Ma KY. Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods. J Agric Food Chem. 2008; 56: 8761-8773.
- Cheng MC, Lin LY, Yu TH, Peng RY. Hypolipidemic and antioxidant activity of mountain celery (*Cryptoenia Japonica Hassk*) seed essential oils. J Agric Food Chem. 2008; 56: 3997-4003.
- Clarkson TB. Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease. J Nutr. 2002; 132: 566-569.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Natural products: secondary metabolites. In: Buchanan B, Griseham W, Jones R. (Ed.). Biochemistry e molecular biology of plants. Berkeley: Amer Soc Plant Physiol; 2000. p.1250-1318.
- Crowell PL. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. J Nutr. 1999; 129: 775S-778S.
- Csallany AS, Kindom SE, Addis PB, Lee JH. HPLC method for quantification of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues. Lipids. 1989; 24(7): 645-651.
- Daniels TF, Killinger KM, Michal JJ, Wright RW Jr, Jiang Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis, and cardiac health. Int J Biol Sci. 2009; 5: 474-488.
- Desai KN, Wei H, Lamartiniere CA. The preventive and therapeutic potential of the squalene-containing compound, roidex, on tumor promotion and regression. Cancer Lett. 1996; 101:93-96.
- Eitel K, Staiger H, Brendel MD, Brandhorst D, Bretzel RG, Haring HU, et al. Different role of saturated and unsaturated fatty acids in beta-cell apoptosis. Biochem Biophys Res Commun. 2002; 299: 853-856.
- Elson CE, Yu SG. The chemoprevention of cancer by mevalonate-derived constituents of fruits and vegetables. J Nutr. 1994; 124: 607-614.

- Escudero NL, Arellano MLD, Luco JM, Giménez MS, Mucciarelli SI. Comparison of the chemical composition and nutritional value of *Amaranthus cruentus* flour and its protein concentrate. *Plant Foods Human Nutr.* 2004; 59(1):15-21.
- Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology.* 2006; 43: S99–S112.
- Farvin KHS, Anandan R, Kumar SHS, Shiny KS, Mathew S, Sankar TV, et al. Cardioprotective effect of squalene on lipid profile in isoprenaline-induced myocardial infarction in rats. *J Med Food.* 2006; 9(4): 531-536.
- Farvin KHS, Surendraraj R, Anandan R. Synergistic effect of squalene and simvastatin on fecal cholesterol excretion in rats. *Asian J Clin Nutr.* 2009; 1: 102-106.
- Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology.* 2004; 40: 185–194.
- Fennema OR. Química de los alimentos. 2 ed. Zaragoza: Acríbia; 2000. 1258p
- Ferreira TAPC, Matias ACG, Arêas JAG. Características nutricionais e funcionais do Amaranto (*Amaranthus* spp.). *Nutrire.* 2007; 32(2): 91-116.
- Ferreira ES, Silveira CS, Lucien VG, Amaral AS. Caracterização físico-química da amêndoa, torta e composição dos ácidos graxos majoritários do óleo bruto da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K). *Alim Nutr.* 2006; 17(2): 203-208.
- Filho MB, Rissin A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. *Cad Saúde Pública.* 2003; 19: 81-91.
- Fontanari GG, Batistuti JP, Arêas JAG. Efeito do consumo de tremço branco (*Lupinus albus*) e seu isolado protéico no metabolismo do colesterol em hamsters hipercolesterolemizados [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2010.
- Frota KMG, Mendonça S, Saldiva PHN, Cruz RJ, Arêas JAG. Cholesterol-lowering properties of whole cowpea seed and its protein isolate in hamsters. *J Food Sci.* 2008; 73(9): H235-H240.

- Fukui K, Tachibana N, Fukuda Y, Takamatsu K, Sugano M. Ethanol washing does not attenuate the hypocholesterolemic potential of soy protein. *Nutrition*. 2004; 984-990.
- Gamel TH, Mesallam AS, Damir AA, Shekib LA, Linssen JP. Characterization of Amaranth Seed Oils. *J Food Lipids*. 2007; 14: 323-334.
- Garcia RWD, Sperandio T, Padezzi J, Lopes G, Alvez FR, Duarte TO. Relação entre consumo alimentar, atividade física e características antropométricas e os lipídeos séricos em pacientes com dislipidemias. *Rev Bras Nutr Clin*. 2002; 17(3): 99-106.
- Genest J. Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. *Rev Bras Nutr Clin*. 2003; 17: 99-106.
- Gorinstein S, Pawelzik E, Delgado-Licon E, Haruenkit R, Weisz M, Tranktenberg S. Characterization of pseudocereal and cereal protein by protein and amino acid analyses. *J Sci Food Agric*. 2002; 82: 886-891.
- Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M, Drzewiecki J, Najman K, Katrich E, et al. Raw and boiled garlic enhances plasma antioxidant activity and improves plasma lipid metabolism in cholesterol-fed rats. *Life Sci*. 2006; 78: 655-663.
- Grajeta H. [Effects of amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds on lipid metabolism in rats.] [resumo] *Bromatol I Chem Toksykol*. 1997; 30(1): 25-30.
- Guerra-Matias AC, Arêas JAG. Digestibilidade in vitro de produto pronto para consumo (snack) a base de amaranto (*Amaranthus cruentus* L.) para pacientes celíacos. *Nutrire*. 2004; 27(1): 43-54.
- Guerra-Matias AC, Arêas JAG. Glycemic and insulinemic responses in woman consuming extrude amaranth (*Amaranthus cruentus* L.). *Nutr Res*. 2005; 25(9): 815-822.
- Guzmán-Maldonado SH, PAREDES-LÓPEZ O. Productos funcionales de plantas autóctonas de Latinoamérica: amaranto, quínoa, judías y plantas medicinales. In: MAZZA G. Alimentos funcionales: aspectos bioquímicos y de procesado. Zaragoza: Acribia; 2000.

- Han-Ping H, Corke H. Oil and squalene in amaranthus grain and leaf. *J Agric Food Chem.* 2003; 51: 7913-7920.
- Han-Ping H, Corke H, Cai J. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Oil and Squalene from Amaranthus Grain. *J Agric Food Chem.* 2003; 51: 7921-7925.
- He HP, Cai YS, 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.
- Horton JD, Bashmakov Y, Shimomura I, Shimano H. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:5987–5992.
- Huang Z, Lin Y, Fang J. Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules.* 2009; 14: 540-554.
- Ishimoto EY, Torres EAFS. Efeito hipolipemiante e antioxidante de subprodutos da uva em hamsters [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública; 2008.
- Jahaniaval F, Kakuda Y, Marcone MF. Fatty acid and triacylglycerol compositions of seed oils of five amaranthus accessions and their comparison to other oils. *JAOC.* 2000; 77(8): 847-852.
- Katsanids E, Addis PB. Novel HPLC analysis of tocopherols, tocotrienols and cholesterol in tissue. *Free Rad Biol Med.* 1999; 27:1137-1140.
- Kelly GS. Squalene and its potential clinical uses. *Alternative Medicine Review.* 1999; 4(1): 29-36.
- Khor HT, Chieng DY. Effects of squalene, tocotrienols and α -tocopherol supplementations in the diet on serum and liver lipids in the hamster. *Nutr Res.* 1997; 17(3): 475-483.
- Ko TF, Weng TM, Chiou RY. Squalene content and antioxidant activity of Terminalia catappa leaves and seeds. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 5343-5348.

- Koolman J, Rohm K. Isoprenoids. In: Color Atlas of Biochemistry, Koolman J, Rohm K. Thieme: Stuttgart; 1996. p.50-51.
- Kritchevsky D, Moyer AW, Tesar WC, Logan JB, Brown RA, Richmond G. Squalene feeding in experimental atherosclerosis. *Cir Res.* 1954; 2: 340-343.
- Kromhout D. Serum cholesterol in cross-cultural perspective. The seven countries study. *Acta Cardiol.* 1999; 54:155-158.
- Laurenti RL, Buchalla CM. Os mitos a respeito das doenças cardiovasculares. *Arq Bras Cardiol.* 2001; 76(2): 99-104.
- Lehmann JW, Putnam DH, Qureshi A. A. Vitamin E isomers in grain amaranths (*Amaranthus* spp.). *Lipids.* 1994; 29: 177-181.
- Leite F. Validação em análise química. 3 ed. Campinas: Ed Átomo; 1998. 224p.
- Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr.* 2004; 134: 3479S-3485S.
- Lottenberg AMP. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2009; 53: 595-607.
- Lucas EA, Khalil DA, Daggy BP, Arjmandi BH. 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.
- Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C, et al. Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes.* 2002; 51: 1437-1442.
- Lynen F. Functional group of coenzyme A and its metabolic relations, especially in the fatty acid cycle. *Federation Proceedings.* 1953; 12: 683-691.
- Lyon CK, Becker R. Extraction and refining of oil from amaranth seed. *J Am Oil Chem Soc* 1987; 64: 233-236.
- Magnoni D, Stefanuto A, Kovacs C. Nutrição ambulatorial em cardiologia. 1 ed. São Paulo: Sarvier; 2007. 250p.

- Malta DC, Cezário AC, Moura L, Neto OLM, Junior JBS. A construção da vigilância e prevenção das doenças crônicas não transmissíveis no contexto do Sistema Único de Saúde. *Epidemiol Serv Saúde*. 2006; 15(3): 47-65.
- Marcone MF, Kakuda Y, Yada RY. Amaranth as a rich dietary source of β -sitosterol and other phytosterols. *Plant Foods Human Nutr*. 2004; 58: 207-211.
- Martirosyan DM, Miroshnichenko LA, Kulakova SN, Pogojeva AV, Zoloedov V. Amaranth oil application for coronary heart disease and hypertension. *Lipids Health Dis*. 2007; 6(1).
- Mendonça S, Saldiva PH, Cruz RJ, Arêas JAG. Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. *Food Chem*. 2009; 116: 738-742.
- Mo H, Elson CE. Apoptosis and cell-cycle arrest in human and murine tumor cells are initiated by isoprenóides. *J Nutr*. 1999; 129: 804-813.
- Morrison WR, Smith LM. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl acetals from lipids with boron fluoride methanol. *J Lipid Res*. 1964; 5: 600-608.
- Murakoshi M, Nishino H, Tokuda H, Owashima A, Okuzimi J, et al.: Inibition by squalene of the tumor-promoting activity of 12-O-tetradecanoyphorbol-13-acetate in mouse-skin carcinogenesis. *Int J Cancer*. 1992; 56: 950-952.
- Nakamura Y, Tonogai Y, Tsumura Y, Shibata T, Uchiyama M. Effect of dietary squalene on the fecal steroid excretions and lipid levels of serum and liver in the rat. *Nutr Res*. 1997; 17: 243-257.
- Nanji AA, Jokelainen K, Tipoe GL, Rahemtulia A, Dannenberg AJ. Dietary saturated fatty acids reverse inflammatory and fibrotic changes in the rat liver despite continued ethanol administration. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 299: 638-644.
- Nanji AA. Role of different dietary fatty acids in the pathogenesis of experimental alcoholic liver disease. *Alcohol*. 2004; 34(1): 21-25.
- National Academy of Sciences. Amaranth: modern prospects for an ancient crop.[S.l.]: National Academy of Sciences, National Academy Press, 1984:1-81.

- National Research Council (NRC). Nutrient Requirements of hamsters. In: Nutrient Requirements of Laboratory Animals. 4 ed. Washington, DC: National Academy Press; 1995. p. 125-139.
- Nenadis N, Tsimidou M. Determination of squalene in olive oil using fractional crystallization for sample preparation. JAOCS. 2002; 79(3): 257-259.
- Nistor A, Bulla A, Filip DA, Radu A. The hyperlipidemic hamster as a model of experimental atherosclerosis. Atherosclerosis. 1987; 68: 159-163.
- Normén L, Bryngelson S, Johnsson M, Evheden P, Eliégard L, Brants H. The phytosterols contents some cereal foods commonly consumed in Sweden and in the Netherlands. J Food Comp Anal. 2002; 15: 693-704.
- Olfert E, Cross BM, Mc William AA. Guide to care and use for experimental animal. 2 ed., v.1, Canadian Council, 1993.
- Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM. Plants sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. J Sci Food Agric. 2000; 80: 939-966.
- Plate AYA, Arêas JAG. Cholesterol-lowering effect of extruded amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) in hipercholesterolemic rabbits. Food Chem. 2002; 76: 1-6.
- Portillo MP, Chavarri M, Duran D, Rodríguez VM, Macarulla MT. Differential effects of diets that provide diferente lipid sources on hepatic lipogenic activities in rats under ad libitum or restricted feeding. Nutr. 2001; 17: 467-473.
- 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.
- Rader DJ, Wilson JM. Gene therapy for lipid disorders. In: Molecular Cardiovascular Medicine. New York: Scientific American; 1995. p. 97-114.
- Ramos S, Moulay L, Granado-Serrano AB, Vilanova O, et al. Hypolipidemic effect in cholesterol-fed rats of a soluble fibre-riched product obtained from cocoa husks. J Agric Food Chem. 2008; 56: 6985-6953.

- Rao CV, Newmark HL, Reddy BS. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis*. 1998; 19: 287-290.
- Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 290: G852-G858.
- Reeves PG, Nielsen FH, Tahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993; 123: 1939-1951.
- Relas H, Gylling H, Miettinen TA. Dietary squalene increases cholesterol synthesis measured with serum non-cholesterol sterols after a single oral dose in humans. *Atherosclerosis*. 2000; 152: 377-383.
- Reynolds K, Chin A, Lees KA, Nguyen A, Bujnowski D, He J. A meta-analysis of the effect of soy protein supplementation on serum lipids. *Am J Cardiol*. 2006; 98: 633-640.
- Richter E, Schafer SG. Effect of squalene on hexachlorobenzene (HCB) concentrations in tissues of mice. *J Environ Sci Health*. 1982; 17: 195-203.
- Rique ABR, Soares EA, Meirelles CM. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. *Ver Bras Med Esporte*. 2002; 8: 244-254.
- Rodríguez VM, Macarulla MT, Chavarri M, Duran D, Portillo MP. Lipoprotein lipase and lipogenic enzyme activities in adipose tissue from rats fed diferente lipid sources. *J Physiol Biochem*. 2001; 57(3): 245-254.
- Ronis MJ, Korourian S, Zipperman M, Hakkak R, Badger TM. Dietary saturated fat reduces alcoholic hepatotoxicity in rats by altering fatty acid metabolism and membrane composition. *J Nutr*. 2004; 134: 904-912.
- Sabarense CMS, Peluzio MCG. Lipídios. In: *Nutrição básica e metabolismo*. Viçosa: Ed. UFV; 2008. p. 155-181.
- Santos CRB, Portella ES, Ávila SS, Soares EA. Fatores dietéticos na prevenção e tratamento de comorbidades associadas à síndrome metabólica. *Rev Nutr*. 2006; 19(3): 389-401.

- Saunders RM, Becker R. Amaranth: a potential food and feed recourse. *Adv Cereal Science and Technology*. 1984; 6: 357-96.
- Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opinion on Lipidol*. 2003; 14: 281-287.
- Scolastici C, Ong TP, Moreno FS. Squalene does not exhibit a chemopreventive activity and increases plasma cholesterol in a Wistar rat hepatocarcinogenesis model. *Nutr Cancer*. 2004; 50(1): 101-109.
- Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC. *Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença*. v. 2. São Paulo; 2003. 2106p.
- Shin DH, Heo HJ, Lee YJ, Kim HK. Amaranth squalene reduces serum and liver lipid in rats fed a cholesterol diet. *Br J Biomed Sci*. 2004; 61(1): 11-14.
- Smith D, Espino-Montoro A, Perez-Jimenez F, Pedro-Botet J, Pereperez J, Ordovas JM. Effect of a high saturated fat and cholesterol diet supplementation with squalene or β -sitosterol on lipoprotein profile in fib hamsters. *Nutr Res*. 2000; 20(9): 1309-1318
- Smith TJ, Yang G, Seril DN, Liao J, Kim S. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. *Carcinogenesis*. 1998; 19: 703-706.
- Spehar CR. *Amaranto: opção para diversificar a agricultura e os alimentos*. 1 ed. Embrapa Cerrados; 2007. 136p.
- Spehar CR, Teixeira DL, Cabezas WARL, Erasmo EAL. Amaranth BRS Alegria: alternative for diversification of cropping systems. *Pesq Agropec Bras*. 2003; 38(5): 659-663.
- Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FAH, Bertolami MC, Afiune NA, Souza AD, et al. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose: departamento de aterosclerose da sociedade brasileira de cardiologia. *Arq Bras Cardiol*. 2007; 88(1): 2-19.
- Stangl GI, Weisse K, Dinger C, Hirche F, Brandsch C, Eder K. Homocysteine Thiolactone-Induced Hyperhomocysteinemia Does Not Alter Concentrations of

- Cholesterol and SREBP-2 Target Gene mRNAs in Rats. *Exp. Biol. Med.* 2007; 232:81-87.
- Steemburgo T, Dall'Alba V, Goss JL, Azevedo MJ. Fatores dietéticos e síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007; 51(9): 1425-33.
- Steffens S, Mach F. Inflammation and atherosclerosis. *Herz.* 2004; 9: 741-748.
- Strandberg TE, Tilvis RS, Miettinen. Variations of hepatic cholesterol precursors during altered flows of endogenous and exogenous squalene in therat. *Biochim Biophys Acta.* 1989; 1001: 150-156.
- Strandberg TE, Tilvis RS, Miettinen TA. Metabolism variables of cholesterol during squalene feeding in humans: comparison with cholestyramine treatment. *J Lipid Res.* 1990; 31: 1637-1643.
- Stryer L. Biosynthesis of membrane lipids and steroid hormones. In: *Biochemistry*. L STRYER, ed., WH Freeman and Co, NY; 1988. p. 547-574.
- Storm HM, Oh SY, Kimler BF. Radioprotection of mice by dietary squalene. *Lipids.* 1993; 28: 555-559.
- Stuchlík M, Zák S. Vegetable lipids as components of functional foods. *Biomed Papers.* 2002; 146(2): 3-10.
- Teixeira DL, Spehar CR, Souza LAC. Agronomic characterization of amaranth for cultivation in the Brazilian Savannah. *Pesq Agropec Bras.* 2003; 38(1): 45-51.
- Terpstra AHM, Lapre JA, Vries HT, Beynen AC. Dietary pectin with high viscosity lowers plasma cholesterol ester transfer protein activity in hamsters. *J Nutr.* 1998; 128(11): 1944-1949.
- Tilvis RS, Miettinen TA. Dietary squalene increases tissue sterols and fecal bile acids in the rats. *Lipids.* 1983a; 18: 32-36.
- Tilvis RS, Miettinen TA. Absorption and metabolic fate of dietary ³H-Squalene in the rat. *Lipids.* 1983b; 18(3): 233-238.
- Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2010; 5: 145-171.

- Tosi EA, Ciappini MC, Masciarelli R. Utilización de la harina integral de amaranto (*Amaranthus cruentus*) en la fabricación de galletas para celíacos. *Alimentaria*. 1996; 269: 49-51.
- Trichopoulou A, Lagiou P. Worldwid patterns of dietary lipids intake and health implications. *Am J Clin Nutr*. 1997; 66: 961S-964S.
- Tuberoso CIG, Kowalczyk A, Sarritzu E, Cabras P. Determination of antioxidant compounds in commercial oilseeds for food use. *Food Chem*. 2007; 103(4): 1494-1501.
- Van der laan PA, Reardon CA, Gets GS. Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24: 12-22.
- Van der Meer R, Vries H, De Glatz JFC. T-butanol extraction of feces: rapid procedure for enzymatic determination of fecal bile acids. In: *Cholesterol metabolism in health and disease studies in the netherlands*. Wageningen: Posen and Looijen; 1985. p. 113-119.
- Van duren BL, Goldschmidt BM. Co-carcinogenic and tumor-promotion agents in tobacco carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 1976; 56: 1237-1342.
- Waner T, Nyska A. The influence of fasting on blood glucose, triglycerides, cholesterol and alkaline phosphatase in rats. *Vet Clin Pathol*. 1994; 23:78-80.
- Weingand KW, Daggy BP. Effects of dietary cholesterol and fasting on hamster plasma lipoprotein. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1991; 29: 425-428.
- World Health Organization. *World Health Report 2002. Reducing risks, promoting healthy life*. Geneva: WHO, 2002.
- World Health Organization. *Diet, nutrition and prevention of chronic diseases*. Geneva: WHO; 2003. (Technical Report Series, 916).
- Wouters K. et al. Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2008; 48: 474-486.
- Wright SM, Salter AM. Effects of soybean on plasma cholesterol and bile acid excretion in hamster. *Comp Biochem Physiol*. 1998; 119b(2): 247-254.

- Yadav NR, Liener IE. Reduction of serum cholesterol in rats fed vegetable protein or an equivalent amino acid mixture. *Nutr Rep Intern.* 1977;5(4): 385-389.
- Yáñez E, Zacarias I, Grander D, Vasquez M, Éstevez AM. Caracterización química e nutricional del amaranto (*Amaranthus cruentus*). *Arch Latinoam Nutr.* 1994; 44(1): 57-62.
- You M, Considine RV, Leone TC, Kelly DP, Crabb DW. Role of adiponectin in the protective action of dietary saturated fat against alcoholic fatty liver in mice. *Hepatology.* 2005; 42: 568–577.
- Zhang Z, Yeung WK, Huang Y, Chen Z. Effect of squalene and shark liver oil on serum cholesterol level in hamsters. *Int J Food Sci Nutr.* 2002; 53: 411-418.
- Zhang Z, Wang H, Jiao R, Peng C, Wong Y, Yeung V. Choosing hamsters but not rats as a model for studying plasma cholesterol-lowering activity of functional foods. *Mol Nutr Food Res.* 2009; 53: 921-930.
- Zubay G. *Biochemistry*. 4 ed. Portland, Or: Wm. C. Brown Publishers, 1999. 1024p.

8 ANEXOS

ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética do Instituto de Medicina Tropical (IMT) da USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11) 3061-7066 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174

São Paulo, 24 de outubro de 2008.

Ilma

Luila Ivini Andrade de Castro,.

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número 027/2008 e intitulado “ Efeito do óleo de amaranto (*Amaranthus cruentus* L.; , BRS-Alegria) no metabolismo de hamster hipercolesterolemizados”, sob a responsabilidade da aluna Luila Ivini Andrade de Castro, orientada pelo Prof. Dr José Alfredo Gomes Áreas,.

Atenciosamente

Dra. Eufrosina Setsu Umezawa
Coordenadora do CEP-IMT

Dra. Eufrosina Setsu Umezawa
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa
IMTSP-USP

ANEXO II – Aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética em Experimentação Animal

1934 | 2009
USP 75 ANOS

Ofício CEEA/FCF/107/2009

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"Efeito do óleo de amaranto ('Amaranthus cruentus' L., BRS-Alegria) no metabolismo lipídico de hamsters hipercolesterolemizados"** (Protocolo nº 256), de responsabilidade da pesquisadora **Luíla Ívini Andrade de Castro** sob a orientação do(a) Prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA, desta Faculdade, em 19 de outubro de 2009.

São Paulo, 20 de outubro de 2009.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEEA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3677 / Fax: (11) 3813-5093 - e-mail: rtrigo@usp.br

ANEXO III – Aprovação do Sub-comitê de Ética Ambiental da Faculdade de Saúde Pública (FSP) da USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COEP/FSP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Of.COEP/ 308 / 08

<i>Protocolo</i>	1884
<i>Projeto de Pesquisa</i>	EFEITO DO ÓLEO DE AMARANTO (AMARANTHUS CRUENTUS L, BRS-ALEGRIA) NO METABOLISMO LIPÍDICO DE HAMSTERS HIPERCOLESTEROLEMIZADOS
<i>Pesquisador(a)</i>	Jose Alfredo Gomes Areas

05 de DEZEMBRO de 2008.

Prezado(a) Orientador(a),

O Sub-Comitê de Ética Ambiental da Faculdade de Saúde Pública – FSP/CEA, analisou as informações quanto aos resíduos químicos a serem gerados durante a execução do projeto de sob responsabilidade de V.S.^a acima intitulado.

Cabe informar que a Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo possui desde 10 de novembro de 2004, "Certificado de Aprovação para o Destino de Resíduos Industriais", sob n.º 45001604, expedido pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), específico para o destino de "reagentes de laboratórios" que tem como procedimento padrão a contratação de empresa licenciada para o transporte e incineração desses resíduos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública em sua 10.ª/08 Sessão Ordinária, realizada em 28.11.08, considerou o protocolo de pesquisa **APROVADO**.

Atenciosamente,

Maria Cecília Loschiavo dos Santos
Professora Doutora

Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – FSP/COEP