UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FCF / FEA / FSP

Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Nutrição Humana Aplicada – PRONUT

THAIS REZENDE SURATY

Efeito da proteína de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. BRS Alegria) na
atividade enzimática hepática da HMG-CoA redutase e seu papel no
metabolismo lipídico em hamsters.

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Orientador: Prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas

São Paulo 2012

THAIS REZENDE SURATY

Efeito da proteína de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. BRS Alegria) na atividade enzimática hepática da HMG-CoA redutase e seu papel no metabolismo lipídico em 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 2012.

Ficha Catalográfica

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

S961e	<p>Suraty, Thais Rezende</p> <p>Efeito da proteína de amaranto (<i>Amaranthus cruentus</i> L. BRS Alegria) na atividade enzimática hepática da HMG-CoA redutase e seu papel no metabolismo lipídico em hamsters / Thais Rezende Suraty. -- São Paulo, 2012.</p> <p>83p.</p> <p>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.</p> <p>Orientador: Arêas, José Alfredo Gomes</p> <p>1. Nutrição aplicada : Ciência dos alimentos 2. Alimentos funcionais : Ciência dos alimentos I. T. II. Arêas, José Alfredo Gomes, orientador.</p> <p>641.1 CDD</p>
-------	---

Dedico esta conquista a querida tia Iracema (*in memoriam*), que me proporcionou a busca pelo estudo e conhecimento.

Agradecimentos

Ao professor Dr. José Alfredo Gomes Arêas por acreditar em mim e me proporcionar a oportunidade de realizar este projeto.

À querida Rosana Aparecida Manólio Soares pela paciência, dedicação, amizade e valiosas contribuições para realização do meu mestrado.

Ao Dr. Gustavo G. Fontanari pelo tempo dedicado em corrigir e pelas considerações importantes para a finalização deste trabalho.

A professora Dr. Flávia Mori pela contribuição para o aprimoramento do projeto.

Aos professores membros da banca julgadora pela disponibilidade de tempo para ler e corrigir a minha dissertação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

Aos alunos Marcelo Rodrigues, Jéssica Dias e Nara Letícia pelo grande ajuda nos ensaios biológicos.

À Dr. Geni Rodrigues Sampaio, técnica do Laboratório de Bromatologia, pelo espaço cedido e auxílio nas análises.

Ao professor Dr. Paulo Hilário Saldiva, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, pela contribuição nas análises histológicas.

Aos funcionários do Biotério do Instituto de Medicina Tropical e Centro de Bioterismo da USP.

Ao Sr. Bastos, sempre presente e auxiliando no decorrer do projeto.

Aos queridos colegas de laboratório: Mariana Séfora, Amanda Correa, Cintia Silva, Luciana Fontes, Érica Ferreira, Liania, Thaise Mendes, Érica Siguemoto, Marcelo Rodrigues, Gustavo Fontanari, Jéssica Dias e Bianka

Caliman pelas risadas e momentos de descontração que tornaram meu trabalho mais agradável.

Aos meus pais Luiz Henrique e Ciomara, por estarem sempre presentes me incentivando e apoiando incondicionalmente.

Meu irmão Luiz H. Suraty Filho, que mesmo longe esteve presente me auxiliando nos gráficos e na formatação do trabalho.

Ao meu noivo Santhiago Cassiano, que compreendeu minhas ausências e me apoiou incondicionalmente em todas as fases deste trabalho.

A minha família, em especial meus avós, que mesmo sem entender meu trabalho, sempre me apoiaram.

A Deus, que ilumina minha vida e me proporcionou serenidade e força para concluir esse trabalho.

RESUMO

Suraty, TR. Efeito da proteína de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. BRS Alegria) na atividade enzimática hepática da HMG-CoA redutase e seu papel no metabolismo lipídico em hamsters [Dissertação de Mestrado em Nutrição Humana Aplicada]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública/ Faculdade de Economia e Administração/ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2012.

Introdução: Atualmente as Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNTs) são um dos maiores problemas de saúde pública da sociedade. É bastante claro o papel da dieta no controle do colesterol e na incidência de doenças cardiovasculares. Neste sentido, o amaranto desperta grande interesse devido a sua propriedade hipocolesterolemizante. Estudos sugerem que seu efeito hipocolesterolemizante está associado à inibição da enzima HMG-CoA redutase, chave na síntese do colesterol endógeno. **Objetivo:** Avaliar a atividade enzimática hepática da HMG-CoA redutase de hamsters alimentados com proteína de amaranto. **Metodologia:** Trinta hamsters foram divididos em 5 grupos e receberam dieta diferenciadas pela fonte protéica. Os grupos I e Icol receberam dieta com 20% de proteína de amaranto e os grupos caseína C e Ccol receberam dieta com 20% de caseína. Os grupos “col” apresentavam dieta com 0,1% de colesterol e 13,5% de gordura de coco. O metabolismo lipídico foi acompanhado através do monitoramento das concentrações plasmáticas de colesterol total, triacilgliceróis, HDL, e fração não-HDL nos animais. A excreção de colesterol e ácidos biliares foram quantificados nas fezes dos animais e o grau de esteatose hepática foi determinada através de análises histológicas do lobo direito do fígado. A atividade da enzima HMGR nos fígados foi medida por meio do Kit CS 1090 da Sigma-Aldrich com adaptações segundo Cong et al, 2012. A análise é baseada em espectrometria com absorvância de 340nm a 37°C, que representa a oxidação de NADPH pela HMG-CoA redutase, na presença do substrato HMG-CoA. **Conclusões:** A proteína de amaranto pode ser considerado um aliado na redução dos agravos

gerados pela dislipidemia, uma vez que reduziu significativamente os níveis de colesterol plasmático e gordura hepática, além de ser demonstrado seu efeito na redução da atividade da enzima HMG-CoA redutase dos animais hipercolesterolemizados que se alimentaram com proteína de amaranto. Uma vez verificado o efeito hipocolesterolemizante e seu possível mecanismo de ação por meio da enzima HMG-CoA redutase, espera-se com isso, estimular o consumo pela população brasileira produção de amaranto no Brasil, como alternativa para diversificar a dieta e a agricultura.

Palavras-chaves: hipercolesterolemia, proteína do amaranto, HMG-CoA redutase, metabolismo lipídico, hamsters.

ABSTRACT

Suraty, TR. Effect of amaranth (*Amaranthus cruentus* L. BRS Alegria) protein in hepatic enzymatic activity of HMG-CoA reductase and its role in lipid metabolism in hamsters [MSC Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública/ Faculdade de Economia e Administração/ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2012.

Introduction: Nowadays, Non-Communicable Chronic Diseases (NCCD) are a major challenge in health public. It is evident the role of diet in the control of cholesterol and incidence of cardiovascular disease. In this sense, amaranth arouses great interest due to its hypocholesterolemic property. Studies suggest that amaranth's hypocholesterolemic effect is associated with the inhibition of the enzyme HMG-CoA reductase, known as the key process to the endogenous cholesterol synthesis. **Objective:** Evaluate the hepatic enzymatic activity of HMG-CoA reductase in hamsters fed with amaranth protein. **Methodology:** Amaranth protein was isolated according to the conventional isoelectric precipitation methodology. Thirty hamsters were divided in 5 groups and were fed diets with different protein source. Experimental groups (I and Icol) had a diet containing 20% of protein amaranth and control groups (C and Cool) received a diet with 20% of casein. Moreover, groups "col" had also a diet with 0.1% cholesterol and 13.5% coconut oil in their composition. The lipid metabolism was accompanied through monitoring of plasma concentrations of total cholesterol, triglycerides, HDL and non-HDL fraction in animals. Excretion of cholesterol and bile acids were quantified in the feces of animals and the degree of hepatic steatosis was determined by histological analysis of the liver's right lobe. The HMGR enzyme activity in the liver was measured by the CS 1090 Kit from Sigma-Aldrich adjusted in accordance with Cong et al, 2012. The analysis is based on spectrometry with absorbance of 340nm at 37 ° C, which represents the oxidation of NADPH by HMG-CoA reductase in the presence of HMG-CoA substrate. **Conclusions:** Amaranth protein can be considered as an ally in reducing of injuries generated by dyslipidemia, since it significantly reduced levels of plasma cholesterol and hepatic fat. Furthermore, it was

demonstrated its effect on reducing activity of HMG-CoA reductase enzyme in hypercholesterolemic animals, which were fed with amaranth protein. Therefore, once verified the hypocholesterolemic effect of amaranth and its possible action mechanism through HMG-CoA reductase enzyme, stimuli on the production of amaranth are expected as an alternative to diversify the diet and agriculture.

Key-words: hypercholesterolemia, amaranth protein, HMG-CoA reductase, lipid metabolism, hamsters.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. Revisão de Literatura	17
2.1 Epidemiologia das DCNT e seu Impacto Financeiro no Sistema Único de Saúde (SUS).....	17
2.2 Papel da dieta no controle das DCNT.....	19
2.3 Amaranto	22
2.3.1 Efeito Hipocolesterolemizante do Amaranto	24
2.4 Metabolismo do colesterol	25
2.5 Estudo em Hamster.....	30
3. JUSTIFICATIVA.....	31
4. OBJETIVO	32
4.1 Objetivo Geral.....	32
4.2 Objetivos Específicos	32
5. MATERIAIS E METODOS	33
5.1 Material.....	33
5.2 Desengorduramento da farinha	33
5.3 Produção do Isolado Protéico (IP) de Amaranto	33
5.4 Caracterização da Matéria- Prima.....	34
5.4.1 Composição centesimal	34
5.4.2 Perfil de aminoácidos totais.....	34
5.5 Ensaio Biológico	35
5.5.1 Dietas	35
5.5.2 Experimento biológico.....	37
5.5.3 Coleta de material biológico.....	39

5.5.4 Consumo Alimentar	41
5.5.5 Ganho de peso e crescimento	42
5.5.6 Digestibilidade verdadeira da proteína	42
5.6 Análises no plasma.....	43
5.7 Análises do fígado	44
5.7.1 Colesterol.....	44
5.7.2 Lipídeos Totais	45
5.7.3 Análise Histológica	45
5.7.4 Análise da atividade da HMG-CoA redutase	46
5.8 Análises nas fezes	47
5.9 Análise estatística	47
5.10 Aspectos éticos.....	48
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6.1 Caracterização da Matéria - Prima.....	49
6.1.1 Composição centesimal	49
6.1.2 Rendimento do isolado protéico.....	51
6.1.2 Perfil de aminoácidos do isolado protéico de amaranto e da caseína	51
6.2 Ensaio Biológico	54
6.2.1 Consumo alimentar e ganho de peso dos animais	54
6.2.2 Digestibilidade Protéica.....	56
6.2.3 Perfil lipídico dos animais	57
6.2.4 Ácidos biliares e colesterol nas fezes	60
6.2.5 Colesterol e lipídeos no fígado	61
6.2.6 Atividade da HMG CoA redutase no fígado	63
6.2.6 Análises histológicas no fígado.....	66
7. CONCLUSÃO	73

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
9. ANEXOS	84

Lista de Tabela

Tabela 1: Estimativa de gastos do SUS com DCNTs – 2008

Tabela 2: Necessidades nutricionais de hamsters em fase de crescimento.

Tabela 3: Composição das dietas (g/kg dieta)

Tabela 4: Composição da ração aprotéica (g/kg)

Tabela 5: Composição centesimal do isolado protéico liofilizado.

Tabela 6: Composição centesimal das dietas experimentais, representadas em g/100g, em base seca.

Tabela 7: Perfil de aminoácidos da caseína e do isolado protéico do amaranto (g/100g de proteína) obtido pelo presente estudo e por Vaz, 2010.

Tabela 8: Recomendação de aminoácido essenciais da FAO/WHO e escore químico de aminoácidos do isolado protéico.

Tabela 9: Consumo alimentar, ganho de peso dos e Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) dos grupos.

Tabela 10: Digestibilidade das dietas

Tabela 11: Concentração plasmática de colesterol total (CT), frações de colesterol e triacilgliceróis (TG) dos animais (mg/dL)

Tabela 12: Excreção fecal de colesterol e ácidos biliares

Tabela 13: Teores de lipídeos totais e colesterol nos fígados dos animais.

Tabela 14: Delta A da atividade da enzima HMG-CoA redutase

Tabela 15: Escores de esteatose hepática e significados clínicos

Tabela 16: Escores de inflamação e significados clínicos.

1. INTRODUÇÃO

As Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNTs) são um dos maiores problemas de Saúde Pública no mundo. Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que as DCNTs são responsáveis por 61% de todas as mortes ocorridas no mundo, ou cerca de 35 milhões de mortes em 2008. No Brasil as DCNTs seguem padrão semelhante, em 2009 as DCNTs foram a principais causas de óbito (BRASIL, 2009 e WHO 2008).

As estatísticas de mortalidade disponíveis para as capitais dos estados brasileiros indicam que a proporção de mortes por DCNTs aumentou em mais de três vezes entre 1930 e 2006 (MALTA et al., 2006).

De acordo com a OMS, um pequeno conjunto de fatores de risco responde pela grande maioria das mortes por DCNTs e por fração substancial da carga de doenças devida a essas enfermidades. Dentre esses fatores, destacam-se as dislipidemias e as doenças cardiovasculares (WHO, 2008).

A aterosclerose é o principal processo anatomopatológico que conduz às doenças cardiovasculares, uma doença multifatorial, que envolve lesão arterial, a qual pode provocar cardiopatia isquêmica, infarto do miocárdio e acidentes vasculares, e sua prevenção passa pela identificação e controle das dislipidemias (LEESON et al., 2000).

Os estudos genéticos, experimentais, clínicos e epidemiológicos têm demonstrado associação entre dislipidemias e a mortalidade pela morbidade cardiovascular, sendo estas as correlações mais consistentes e bem estabelecidas de todas as áreas da epidemiologia (YOSHIDA et al., 2003).

O organismo humano possui homeostase própria de colesterol endógeno, sua síntese provém principalmente de ácidos biliares, principal fonte (800 – 1200 mg/dia). A dieta contribui com uma parte menor do colesterol presente no lúmen (300 mg/dia), além disso, apenas 50 % desse montante será absorvido (DIETSCHY, 1984 e LOTEMBERG, 2008). Embora o colesterol da dieta não seja um fator agravante para o aumento dos níveis plasmáticos de colesterol, outros componentes presentes nos alimentos da dieta, como

lipídeos, fibras, antioxidantes e proteínas de origem vegetal, podem colaborar para o seu controle.

Nesse contexto, diversos estudos têm sido conduzidos no sentido de elucidar o mecanismo pelo qual algumas proteínas vegetais como, soja, quinoa, feijão caupi, tremço e o próprio amaranto, agem na redução dos níveis plasmáticos de colesterol (TOVAR, 2005; TAKAO et al., 2005; SHUKLA et al., 2006; ESCUDERO, 2006; FROTA et al., 2008; FONTANARI et al., 2012).

Pesquisas recentes com a proteína da soja evidenciaram seu efeito em inibir a atividade da HMG-CoA redutase, enzima chave na biossíntese do colesterol endógeno (TOVAR et al., 2005; SHUKLA et al., 2007).

Mendonça et al. (2009) avaliando o potencial da proteína do amaranto no metabolismo do colesterol em hamsters hipercolesterolemizados, descreveram o efeito da proteína do amaranto em reduzir o colesterol sérico. Contudo o mecanismo de ação desse nutriente ainda precisar ser melhor compreendido.

Uma vez demonstrado que a proteína do amaranto é a fração responsável majoritariamente pelo efeito hipocolesterolemizante, faz-se necessário investigar os mecanismos pelo qual essa ação ocorre.

2. Revisão de Literatura

2.1 Epidemiologia das DCNT e seu Impacto Financeiro no Sistema Único de Saúde (SUS)

Desde as ultimas décadas do século passado, seguindo tendência mundial, observa-se no Brasil dois processos que tem produzido importantes mudanças no perfil das doenças ocorrentes em sua população.

O Brasil passou por processo acelerado de industrialização e urbanização, que teve profundo impacto na dinâmica populacional, cultural e sanitária do país. Por outro lado, a inserção de novos processos de trabalho determinou mudanças de estilos de vida da população que vêm sendo muitas vezes estimulados pela globalização de mercados e da comunicação. Esses fatores refletiram-se no quadro de Saúde Pública do país gerando um grande aumento da prevalência de DCNTs, como o diabetes, hipertensão, obesidade, doenças cardiovasculares e câncer (BRASIL, 2009).

Essas doenças passaram a predominar no quadro de estatísticas de Saúde Pública, tornando-se um dos maiores problemas na atualidade de países em desenvolvimento e principalmente em grupos sociais menos favorecidos, refletindo em altos gastos financeiros aplicado no tratamento ambulatorial, internações hospitalares e reabilitação pelo SUS. No Brasil, essas doenças são responsáveis por 55,2 % dos total de óbitos registrados e compreendem em 58 % dos anos de vida vividos, em mortes prematuras (SCHRAMM et al, 2004).

Resultados obtidos pelo sistema VIGITEL em 2009 (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), demonstraram que no conjunto da população adulta de 27 cidades estudadas, a frequência do diagnóstico médico para dislipidemia foi de 16,9 %, com prevalência maior entre as mulheres (19,3 %) do que nos homens (14,1 %). Em ambos os sexos, o diagnóstico da doença se torna mais comum em adultos. Entre os homens, a frequência máxima é observada no estrato de maior escolaridade, entre as mulheres, naquelas com menor escolaridade.

A magnitude de parte das DCNTs pode ser avaliada pelas doenças cardiovasculares, responsáveis por 31 % do total de óbitos por causas conhecidas (BRASIL, 2009).

As doenças cardiovasculares são responsáveis por 18 milhões de mortes ao ano no mundo, sendo as doenças isquêmicas do coração e as doenças cerebrovasculares responsáveis por dois terços desses óbitos e por, aproximadamente, 22 % dos 18 milhões de óbitos por todas as causas de DCNTs. (BEAGLEHOLE ; SARACCI, e PANICO, 2008).

Dados observados na Campanha Nacional contra o Colesterol de 2002 revelam que 13% da população adulta brasileira apresenta níveis de colesterol total $>240\text{mg/dL}^2$, o que corresponderia hoje aproximadamente a 14 milhões de pessoas com hipercolesterolemia que seriam indivíduos para tratamento com estatinas. No Estado de São Paulo, esse número chegaria a 3,2 milhões de pacientes (MARSOLA et al. 2012).

Por serem doenças consideradas de longa duração, as DCNTs estão entre as doenças que mais demandam ações, procedimentos e serviços de saúde. Os gastos decorrentes dessa demanda são denominados custos diretos. A **Tabela 1** apresenta estimativas destes custos no SUS. Dos chamados custos indiretos, decorrentes do absenteísmo, aposentadorias precoces e perda de produtividade, o Brasil não dispõem de estudos que possam quantificá-los.

Tabela 1: Estimativa de gastos do SUS com DCNT - 2008

GASTOS SUS	R\$	%	R\$/hab.
Estimativas Gastos Ambulatoriais	3.824.175.399,40	35	22,2
Gastos Internações	3.738.515.448,92	34,2	21,7
TOTAL	7.562.690.848,32	69,1	44,0

Fonte: SIH – SUS/ SIA-SUS

Estudo recente da Sociedade Brasileira de Cardiologia demonstrou que o impacto econômico dos gastos com DCVs (doenças cardiovasculares)

representam aproximadamente 0,64 % do Produto Interno Bruto (1,766 bilhões). Além disso, uma perda potencial adicional de 0,97 % do PIB foi atribuída à perda de renda (AZAMBUJA et al., 2008).

Estes números demonstram que as DCVs representaram um impacto potencial de pelo menos R\$ 30,8 bilhões, correspondendo a 1,74 % do PIB em 2008. Este valor foi equivalente a R\$ 500,00 per capita (para a população de 35 anos ou mais) e R\$9.640,00 por paciente (AZAMBUJA et al., 2008).

2.2 Papel da dieta no controle das DCNT

A dieta possui um papel determinante nas DCNTs. A alimentação é considerada um dos fatores modificáveis mais importantes para o risco de DCNTs, devendo ser incluída entre as ações prioritárias de Saúde Pública (WHO, 2003). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2008), 80 % dos casos de doenças coronarianas poderiam ser evitados com mudanças factíveis nos hábitos alimentares, nos níveis de atividade física e no uso de produtos derivados do tabaco.

A epidemiologia nutricional tem mostrado uma forte associação entre alguns padrões de consumo alimentar e a ocorrência de DCNTs. Uma alimentação inadequada, rica em gorduras saturadas e colesterol, alimentos altamente refinados e processados, e pobre em frutas, legumes e verduras está associada ao aparecimento de diversas doenças como aterosclerose, hipercolesterolemia, hipertensão arterial, doença isquêmica do coração, infarto agudo do miocárdio, diabetes mellitus e câncer (MAN, 2002; KRIS-ETHERTON et al., 2001).

Estudos recentes demonstram que o consumo de proteínas de origem vegetal apresentam efeito hipocolesterolêmico, através de um possível mecanismo endógeno ainda não elucidado, que poderia ser benéfico na prevenção e controle de DCNTs (FROTA et al., 2008; MENDONÇA et al., 2009; FONTANARI, 2012).

Tendo em vista que o colesterol intracelular regula negativamente a

síntese de colesterol e a captação das LDL plasmáticas, alguns autores têm mostrado os efeitos da dieta na modulação de genes codificadores de enzimas da via da síntese de colesterol endógeno, com particular destaque para a HMG-CoA redutase, evidenciando o efeito hipocolesterolemizante da proteína da soja (IRITANI et al., 1996; YAMAMOTO et al., 2004; CORCOS et al., 2005; TOVAR et al., 2005; TAKAO et al., 2005; FEIGE et al., 2006; TORRES et al., 2006).

Estudos em ratos alimentados com isolado protéico de soja, mostraram seu efeito na redução da expressão da HMG-CoA redutase (TOVAR et al., 2005; SHUKLA et al., 2007). No entanto, o mecanismo de ação desses componentes da dieta ainda é controverso e tem sido alvo de muitas investigações.

Apesar dos trabalhos citados mostrarem o efeito da proteína vegetal no metabolismo lipídico atuando na síntese e degradação do colesterol, eles não esclarecem o mecanismo de ação da mesma, apenas reforçam a hipótese de que a proteína destes alimentos age em enzimas e ou receptores no fígado e não apenas na absorção intestinal do colesterol (IRITANI et al., 1996; MORIYAMA et al., 2004; TOVAR et al., 2005; BADGER et al., 2008).

O efeito das proteínas vegetais em reduzir o colesterol poderia correlacionar-se com o perfil de aminoácidos entre sua composição e a caseína. Alguns autores atribuem esse efeito à proporção lisina/arginina, que é de 0,9. A proteína do amaranto apresenta proporção inferior, que é 0,5 (MENDONÇA, 2006) e a caseína 2,5 (KAYASHITA et al., 1997). Sugere-se que, quanto menor esta proporção, menor a colesterolemia.

Por outro lado, Mendonça (2006) simulou o perfil de aminoácidos do amaranto e da caseína e não observou efeito significativo no colesterol plasmático de hamsters hipercolesterolemizados, descartando a hipótese de que o perfil de aminoácidos seria o responsável pelo pronunciado efeito hipocolesterolemizante do isolado protéico de amaranto.

Outro mecanismo proposto para explicar a redução da concentração de colesterol plasmático é atribuído à menor digestibilidade da proteína de origem vegetal. Segundo Terpstra et al. (1994), a proteína da soja possui menor

digestibilidade que a caseína e a fração não digerida pode ter efeito metabólico análogo ao das fibras, determinando a formação de complexos insolúveis com colesterol que são excretados nas fezes devido à redução de sua absorção (SUGANO et al., 1990; MENDONÇA et al., 2009). Neste caso, com o aumento da excreção e consequentemente redução da absorção de colesterol há mobilização do colesterol endógeno para a síntese de ácidos biliares, uma vez que o colesterol é seu precursor (MADANI et al., 1998).

Segundo Nagaoka et al. (1999), o hidrolisado protéico de soja reduz a concentração de colesterol plasmático de forma similar à proteína intacta. O autor enfatiza a teoria de que parte das proteínas de soja não são totalmente degradada pelas enzimas digestivas e resultam na formação de peptídeos, que podem agir no metabolismo do colesterol endógeno e/ou podem ter propriedades similares às das fibras com capacidade de se ligarem ao colesterol, e consequentemente aumentar sua excreção.

Mendonça et al. (2009), sugeriram que a formação de peptídeos bioativos, produzidos pela digestão da proteína do amaranto, poderia afetar não só a absorção de colesterol intestinal mas também no metabolismo endógeno. Proteínas e peptídeos formados por sua digestão podem atuar diretamente na síntese de colesterol e/ou na atividade/expressão do receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDLR) (LOVATI et al., 2000; DURANTI et al., 2004).

Nos últimos anos foram descobertos peptídeos bioativos em produtos de origem vegetal, como a soja, o trigo, o agrião, a ervilha e o próprio amaranto (DZIUBA et al., 2003; SOARES, 2008). Uma vez absorvidos, esses fragmentos teriam uma ação reguladora em enzimas ou transportadores (KORHONEN e PIHLANTO, 2003; KITTS e WEILER, 2003), que exercem diversas funções metabólicas, regulando enzimas ou interferindo em ciclos celulares (DZIUBA et al., 2003).

Os peptídeos bioativos provenientes da dieta são formados por pequenas cadeias que geralmente contém 2 a 9 resíduos de aminoácidos (KITTS e WEILER, 2003). Apesar de ocorrer a formação de fragmentos de diversos tamanhos, evidências mostram que apenas os di e tripeptídeos sejam

absorvidos em uma velocidade maior, tanto em relação às proteínas como aos aminoácidos livres. Esses compostos seriam reconhecidos por enzimas específicas, entre elas a HMG-CoA redutase, determinando a redução da concentração de colesterol. Contudo, esse mecanismo ainda não foi esclarecido (NAGAOKA, 1999; FUKUI et al., 2004; TORRES et al., 2006; SHUKLA et al., 2007; ZHONG et al., 2007).

Na tentativa de explicar a menor concentração de colesterol hepático e sérico em animais alimentados com fontes protéicas de origem vegetal, pesquisadores têm concentrado seus esforços em avaliar o efeito da ingestão dessas proteínas na modulação da expressão de genes e proteínas-chave na homeostase do colesterol, evidenciando um efeito no controle molecular do colesterol celular (IRITANI et al., 1996; YAMAMOTO et al., 2004; TAKAO et al., 2005; CORCOS et al., 2005; FEIGE et al., 2006; TORRES et al., 2006; SHUKLA et al., 2007).

2.3 Amaranto

O amaranto é um pseudocereal da família das *Amarantaceas*, originário da região dos Andes, cultivado pelas civilizações Inca e Asteca há mais de 2000 anos. Era considerado um alimento sagrado e dele eram aproveitados as sementes, folhas e caules. Com a chegada dos espanhóis o seu cultivo foi banido por questões religiosas. A partir de 1960 esta planta, que era cultivada esparsamente pelas populações indígenas do Peru foi redescoberta e suas notáveis propriedades nutricionais reconhecidas. A partir desta época, seu cultivo foi disseminado pela Europa, África e Ásia. Atualmente é cultivado principalmente no México, América Central, nos territórios andinos da América do Sul e mais recentemente no Brasil (NRC, 1995; AMAYA-FARFAN et al., 2005).

No Brasil, pesquisadores e parceiros da Embrapa e do Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, buscam adaptar o amaranto ao cultivo do país a fim de diversificar os sistemas produtivos desde 1996. Atualmente

crece a área sob o plantio direto, por vantagens econômicas ao produtor e ao meio ambiente.

As interações de pesquisas que envolvem os membros da cadeia produtiva se tornam uma necessidade. Assim, os estudos genéticos e agronômicos devem estar associados a outros sobre composição nutricional e formas de transformação, criando perspectiva de demanda (EMBRAPA, 2007).

Com isso, espera-se estimular plantio e consumo do amaranto como alternativa para diversificar a agricultura, tornando-a biológica e economicamente sustentável, resultando em dieta diversificada e mais saúde para a população.

O amaranto apresenta grande potencial para se tornar cultivo integrado aos sistemas tradicionais ou modernos de exploração agropecuária. Pode ter importante papel na economia mundial, pela facilidade de cultivo comercial e por ser fonte de nutrientes que apresentam propriedades nutracêuticas (SPEHAR e TEIXEIRA, 2004).

Segundo dados estatísticos de cultivo, o Brasil pode, a médio prazo, se tornar um grande produtor de amaranto, contribuindo na diversificação agrícola e alimentar (SPEHAR e TEIXEIRA, 2004).

O interesse mundial pelo amaranto é recente. A partir dos anos 80 surgem as primeiras investigações, lideradas pela Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos (MONTEROS et al., 1998), sendo reconhecido como uma das culturas mais promissoras para alimentar a humanidade, devido ao seu elevado valor nutricional e potencial agronômico (SILVA-SÁNCHEZ et al., 2008). Desde então, o interesse por essa planta tem aumentado em todo o mundo.

Uma das razões pela qual o interesse pelo amaranto vem crescendo é devido ao seu alto valor nutritivo. Na sua composição média, o grão contém de 15-16 % de proteína, 7-8 % de gordura, 50-60 % de amido (PEDERSEN et al, 1987) e 14,2 % de fibra alimentar (TOSI, 2001).

Também apresenta alto teor de fibras solúveis (4,2g em 100g) em comparação a outros cereais como o trigo (2,3g em 100g), o milho (2g em 100g) e a aveia (1,9g em 100g) (MENDONÇA, 2006).

O teor protéico e o perfil de aminoácidos tornam o amaranto uma atrativa fonte protéica, pois apresenta conteúdo expressivo de aminoácidos essenciais, especialmente lisina (6,2 %) e aminoácidos sulfurados (4 %), que são limitantes na maioria dos grãos (GORINSTEIN et al., 1998; SILVA-SÁNCHEZ et al., 2008; MENDONÇA et al., 2009).

O perfil de aminoácidos do amaranto é similar entre diferentes espécies, (BRESSANI, 1989). Em comparação às recomendações de aminoácidos essenciais da FAO/WHO, o aminoácido mais deficiente no amaranto é a leucina, entretanto, essa deficiência não atinge valores inferiores a 80 % (IMERI et al., 1987).

O amaranto também é boa fonte de zinco, fósforo e cálcio, além de ser uma alternativa de consumo para quem tem doença celíaca. Apresenta maior teor de lipídios (6-9 %) superior ao de outros cereais (GAMEL et al., 2007).

Estudos conduzidos em diferentes modelos biológicos mostraram que o consumo do grão de amaranto contribui para o controle da concentração do colesterol plasmático. Pesquisadores têm estudado quais substâncias seriam responsáveis pelo efeito hipocolesterolemizante do amaranto, sendo este efeito associado a diversos nutrientes presentes em sua composição (CHATUVERDI et al., 1993; GRAJETA, 1997; PLATE e ARÊAS, 2002; CZERWIŃSKI et al., 2004; MENDONÇA et al., 2009).

2.3.1 Efeito Hipocolesterolemizante do Amaranto

Várias hipóteses foram sugeridas para justificar o efeito do amaranto em reduzir as concentrações plasmáticas de colesterol, destacando-se o perfil de aminoácidos de sua proteína e o seu teor de fibras alimentares totais e solúveis (CHATUVERDI et al., 1993; QURESHI, 1996; LEHMAN, 1996; GRAJETA, 1997; PLATE e ARÊAS, 2002).

Alguns autores atribuíram o efeito hipocolesterolemizante do amaranto à composição de ácidos graxos (rica em insaturados) ou ainda a componentes presentes na fração solúvel do óleo, como o esqualeno ou tocotrienóis

(CHATUVERDI et al., 1993; LEHMAN, 1996). Contudo, experimento comparativo realizado em ratos para verificar o efeito da ingestão do amaranto integral e do desengordurado na concentração plasmática de colesterol, mostrou que a capacidade do grão integral era similar ao desengordurado (GRAJETA, 1997).

Qureshi et al. (1996) observaram propriedades nutraceuticas no amaranto e sugeriram a presença de um potente inibidor da enzima HMG-CoA redutase, embora não tenham definido qual seria este componente.

Plate e Arêas (2002) verificaram que componentes do grão livres de lipídeos, conseqüentemente das demais substâncias lipossolúveis, como o esqualeno, eram suficientes para responder pelo efeito hipocolesterolemizante, apontando que essa fração não respondia ao efeito observado.

Mais recentemente, Mendonça et al. (2009), evidenciaram, que a proteína isolada do amaranto, é capaz de reduzir em 48 % o colesterol total e em 57 % a fração de colesterol não-HDL em animais previamente hipercolesterolemizados por meio de dieta rica em caseína,

Após a comprovação de que a proteína do amaranto é a fração responsável majoritariamente pelo efeito hipocolesterolemizante do referido pseudocereal, faz-se necessário avaliar o efeito da ingestão deste isolado na atividade de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos e na modulação da síntese do colesterol hepático.

Esta investigação é fundamental para tentar compreender o efeito da ingestão do isolado protéico de amaranto na redução da concentração plasmática de colesterol, uma vez que ainda não existem estudos realizados sobre o assunto.

2.4 Metabolismo do colesterol

O colesterol é componente de fundamental importância para as células, pois participa de inúmeros processos biológicos, entre eles a formação de membranas, a síntese hormonal, a produção da vitamina D e a produção de

ácidos biliares necessários à absorção de gordura pelo intestino. Com exceção dos hepatócitos, tecidos esteroideogênicos e intestino, os demais tecidos não são capazes de metabolizar e exportar colesterol em quantidade significativa.

A síntese bioquímica dos lipídeos acontece a partir do acetil-CoA do qual pode ocorrer a formação tanto de ácidos graxos quanto dos isoprenóides (GLEW, 2007). A sua biossíntese apresenta alguns passos catalisados por enzimas que se localizam no citosol celular e outros por enzimas que se encontram na membrana do retículo endoplasmático (McKee e McKee, 1999). A **Figura 1** mostra as principais etapas da síntese celular do colesterol.

Figura 1: Principais etapas da síntese celular do colesterol.

Para que ocorra a absorção de colesterol, bem como de lipídeos e de vitaminas lipossolúveis no lúmen intestinal, é essencial a presença dos ácidos biliares, uma vez que estes possuem uma característica anfipática e habilidade

de formar micelas nas quais o lipídeo é transportado da barreira aquosa luminal para a membrana da borda em escova das células epiteliais intestinais. Nos humanos, a maioria dos sais biliares circulantes está conjugada aos aminoácidos glicina e taurina, normalmente conhecidos como ácido cólico e quenodesoxicólico, respectivamente (HUI e HOWLES, 2005; KULLAK-UBLICK et al, 2004).

Após a absorção, o colesterol livre, fosfolipídeos, mono e diacilgliceróis e os ácidos graxos livres são reesterificados e reorganizados em uma forma mais estável no enterócito para que possam ser transportados na circulação. A reesterificação ocorre pela ação da enzima acil CoA: colesterol aciltransferase (ACAT), cuja atividade é estimulada por altas concentrações de colesterol dietético (LU, LEE e PATEL, 2001; RAMOS et al., 2007).

Por ser insolúvel em ambientes hidrofílicos, o colesterol é transportado no sangue essencialmente pelas lipoproteínas (GURR, FRAYN e HARWOOD, 2002). As lipoproteínas são responsáveis por transportar algumas proteínas e lipídios no sistema vascular (DANIELS et al., 2009).

As lipoproteínas possuem um núcleo de lipídeos neutros (triacilgliceróis e ésteres de colesterol) circundado por uma camada de apolipoproteínas anfipáticas, fosfolipídeos e colesterol. As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), as de baixa densidade (LDL) e as de alta densidade (HDL) compõem três das seis grandes sub-frações de lipoproteínas, que também incluem quilomícrons (QM), remanescentes de quilomícrons (QMr) e lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) (DANIELS et al., 2009).

A **Figura 2** mostra o metabolismo do colesterol e das lipoproteínas de forma simplificada.

Figura 2: Metabolismo do colesterol e das lipoproteínas.

Os QM são formados de acordo com a ingestão de lipídios da dieta (triacilgliceróis, colesterol e fosfolípidos), são ricos em triacilgliceróis, e possuem apolipoproteína (apo) B48. Os quilomícrons recém sintetizados são secretados nos vasos linfáticos e chegam à circulação sanguínea por meio do ducto torácico. Na circulação, adquirem apoC e apoE, e sofrem a ação da enzima lipase de lipoproteína (LLP), que catalisa a hidrólise de triacilgliceróis e promove a liberação de ácidos graxos para os tecidos (LOTTEMBERG, 2008).

Quando mais de 90 % dos triacilgliceróis foram degradados, o QM reduz seu tamanho e aumenta sua densidade. Ocorre então a formação dos remanescentes de quilomícrons (QMr), partículas ricas em colesterol, que são rapidamente captadas pelo fígado por meio de sua ligação a receptores de VLDL (VLDLR) e de LDL (LDLR), e à proteína relacionada aos receptores de LDL (LRP) que reconhecem e se ligam a apoE (KWITEROVICH, 2000). Na célula hepática, o colesterol proveniente do QMr é destinado à produção de VLDL ou à formação de sais biliares, forma predominante de eliminação do colesterol do organismo.

As LDL são as principais lipoproteínas transportadoras de colesterol

hepático para os tecidos periféricos. Por outro lado, a HDL remove o excesso de colesterol dos tecidos transportando-os de volta para o fígado, o que caracteriza o transporte reverso de colesterol (LOTTEMBERG, 2008; DANIELS et al., 2009). Por seu efeito na redução do acúmulo de colesterol nas paredes das artérias, ação da HDL é um dos mecanismos que reduz o desenvolvimento da aterosclerose (SVIRIDOV e NESTEL, 2002; DANIELS et al., 2009).

O colesterol das células periféricas é captado pelas HDL, em que é esterificado pela ação da enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) (SVIRIDOV e NESTEL, 2006; LOTTEMBERG, 2008).

Em condições normais, as LDL transportam cerca de 65 % a 70 % do colesterol plasmático total. A maior parte das LDL é removida da circulação pelo fígado e o restante, pelos tecidos periféricos. Essas lipoproteínas se ligam a receptores específicos, são internalizadas e degradadas. Para regular a concentração plasmática de colesterol, receptores B/E removem cerca de dois terços das LDL circulantes (LOTTEMBERG, 2008).

A 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) é a enzima-chave na biossíntese do colesterol endógeno. Em situações de baixa concentração de colesterol sua atividade é aumentada, de forma a manter o controle da homeostase de colesterol endógeno. Em situações contrárias sua ação é reduzida (LOTTEMBERG, 2008).

A regulação da síntese e captação de éster de colesterol nos hepatócitos se dá por receptores nucleares SREBP (sterol regulatory element binding protein) e LXR (receptor X hepático). O estímulo de SREBP aumenta a transcrição de genes relacionados à síntese de colesterol, enquanto o estímulo de LXR facilita o transporte reverso, e aumenta a secreção de ácido biliares (DANIELS, 2009).

O mecanismo de regulação da concentração intracelular de colesterol ocorre quando o aumento do conteúdo de colesterol na célula leva à diminuição da atividade da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) redutase, que tem papel-chave na síntese de colesterol, além da redução da expressão dos receptores de LDL e aumento da atividade da enzima

acilcolesterol aciltransferase (ACAT), a fim de estocar colesterol na forma esterificada, uma vez que o excesso de colesterol livre é tóxico para a célula.

2.5 Estudo em Hamster

O uso de animais em pesquisas tem como objetivo central correlacionar os fenômenos biológicos entre as espécies, principalmente os humanos. Nos últimos anos houve um aumento do interesse em se pesquisar um modelo ideal e apropriado para o estudo do metabolismo lipídico. Sabe-se que alguns modelos animais não são adequados para estudos de metabolismo lipídico pela falta de similaridade com os humanos em relação ao perfil de lipoproteínas plasmáticas.

O hamster é um roedor pequeno, sensível a dietas suplementadas com colesterol e ricas em gordura (DORFMAN, 2003). Eles transportam uma significativa porção de colesterol plasmático, cerca de 50 %, nas frações de lipoproteínas LDL, sendo mais semelhantes aos humanos que outros roedores (LOCK, 2005).

Estudo realizado por Terpstra et al. (1991) sugeriu que a indução de hipercolesterolemia poder ser feita com adição de quantidades fisiológicas de colesterol à dieta (0,05 % a 0,1 %).

Nos últimos anos, estudos com hamsters vem sendo utilizado em pesquisas de metabolismo lipídico envolvendo dietas suplementadas com gordura e colesterol (MENDONÇA, 2006; FROTA, 2008; FONTANARI, 2012).

Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo investigar nestes animais, o efeito do consumo de dietas contendo isolado protéico de amaranto sobre a atividade da enzima HMG-CoA redutase.

3. JUSTIFICATIVA

Estudos realizados por diversos autores sugerem que o mecanismo de redução do colesterol promovido ao amaranto está relacionado com a ação da sua proteína (PLATE e ARÊAS, 2002; MENDONÇA et al., 2009). Ainda que a ação hipocolesterolêmica seja explicada por sua fração protéica, os mecanismos pelos quais a proteína age ainda não estão totalmente esclarecidos.

Com isso, o presente estudo se propõe a avaliar a atividade enzimática hepática da HMG–CoA redutase e sua influência no metabolismo lipídico de hamsters alimentados com dietas experimentais contendo isolado protéico em sua composição.

Esta investigação é fundamental para tentar compreender o efeito da ingestão do isolado protéico de amaranto na redução da concentração plasmática de colesterol em hamsters, uma vez que ainda não existem estudos realizados sobre o assunto.

O esclarecimento destes mecanismos poderá contribuir para o estímulo do uso do amaranto pela população, e conseqüentemente sua produção, resultando em sólidas contribuições biológicas e sociais.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade enzimática hepática da HMG–CoA redutase e sua relação com o metabolismo lipídico de hamsters alimentados com proteína isolada de amaranto (*Amaranthus cruentus*).

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Isolar a proteína do amaranto;

4.2.2 Analisar o efeito da dieta no peso corporal e no peso do fígado dos animais;

4.2.3 Avaliar mudanças no perfil lipídico utilizando análises plasmáticas de colesterol total e frações (HDL e não HDL) e as concentrações de triacilgliceróis;

4.2.4 Avaliar a atividade enzimática da HMG–CoA redutase nos microssomas hepáticos dos animais;

4.2.5 Avaliar o grau de esteatose hepática dos animais.

5. MATERIAIS E METODOS

5.1 Material

Foi utilizado o amaranto (*Amaranthus cruentus* L. variedade BRS-Alegria) proveniente da Empresa Ceileiro Com. Ind. Ltda (Brasília - DF). Após o recebimento os grãos foram enviados para a empresa Moinhos Vieira (Tatuí, São Paulo), para serem moídos em moinhos de martelos até granulometria de 0,4mm.

A farinha obtida foi armazenada sob refrigeração (4°C) para posterior obtenção de isolados protéicos usados na produção das dietas experimentais.

5.2 Desengorduramento da farinha

A farinha de amaranto foi desengordurada no Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), localizado em Campinas-SP.

O amaranto foi submetido ao processo de prensagem a frio, utilizando uma prensa modelo Ecirtec MPE-40. A amostra proveniente do processo de prensagem (torta residual) foi utilizada na produção do isolado protéico.

5.3 Produção do Isolado Protéico (IP) de Amaranto

A produção do isolado protéico de amaranto foi realizada pelo princípio de solubilização alcalina seguido de precipitação isoelétrica da proteína segundo Martinez e Añon (1996), com modificações por Mendonça et al (2009).

Para cada parte de farinha desengordurada, foram adicionadas dez partes de água. O pH foi ajustado e controlado a 11,0 com NaOH 1 mol L⁻¹ e a mistura agitada por 5 horas a temperatura ambiente, permanecendo em

repouso por 12 horas a 4°C . Posteriormente, a mistura foi filtrada e centrifugada a 9.000 x g por 20 minutos a 10 °C.

Em seguida o sobrenadante foi ajustado a pH 5,7, com HCl 1 mol L⁻¹, para ocorrer a precipitação isoelétrica. O homogenato permaneceu por 12 horas a 4°C para floculação. Uma nova centrifugação a 9.000 x g foi realizada e o precipitado congelado (- 20°C) para posterior liofilização.

Após obtenção do isolado protéico liofilizado, o mesmo foi triturado em moedor de café (Cadence MDR301 – Brasil) homogeneizado e congelado (- 20°C) até o momento de uso.

5.4 Caracterização da Matéria- Prima

5.4.1 Composição centesimal

Foi realizado no IP análises de umidade por dessecação a 105 °C até peso constante; cinzas, por incineração da matéria orgânica a 550°C; e lipídeos, por extração a quente com éter de petróleo, de acordo com metodologias descritas pela AOAC (2005). Os carboidratos totais foram calculados por diferença.

Para quantificação do teor protéico, foi determinado o valor de nitrogênio utilizando o método de micro-Kjeldhal (AOAC, 2005), usando o fator de 6,25 para conversão em proteína. Todas as análises foram realizadas em triplicata e expressas em média ± desvio padrão. As análises foram realizadas em triplicatas.

5.4.2 Perfil de aminoácidos totais

As análises do perfil de aminoácidos totais do isolado protéico de amaranto e da caseína foram realizadas pela empresa CBO Assessoria & Análise (Campinas, São Paulo).

A preparação das amostras para análise de aminoácidos totais envolveu as etapas de hidrólise para liberação dos aminoácidos, preparação dos hidrolisados através de secagem e derivatização e separação dos derivados de feniltiocarbamil por cromatografia líquida de alta eficiência, de acordo com metodologia proposta por White et al. (1986).

5.5 Ensaio Biológico

5.5.1 Dietas

As dietas dos animais seguiram as recomendações nutricionais da National Research Council (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 et al., 1993), mostradas na **Tabela 2**.

Tabela 2: Necessidades nutricionais de hamsters em fase de crescimento.

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

Fonte: National Research Council (1995).

As rações foram obtidas sob encomenda, com ingredientes purificados, sendo peletizadas e embaladas pela empresa Rhoster Indústria e Comércio LTDA, Vargem Grande Paulista, São Paulo e posteriormente armazenadas em freezer para conservação.

A caseína foi utilizada como fonte protéica das rações controle. O isolado protéico de amaranto produzido em escala laboratorial foi fornecido para a produção das rações experimentais. Para avaliar o efeito do consumo da proteína de amaranto juntamente com o colesterol dietético foi adicionado 0,1 % de colesterol (*Sigma*) e 13,5 % de óleo de coco às rações, de forma a produzir um moderado aumento da colesterolemia dos animais (FONTANARI et al., 2012; FROTA et al., 2009; MENDONÇA et al., 2008; ZHANG et al., 2009). A composição das dietas foram representadas na **Tabela 3**.

Tabela 3: Composição das dietas (g/kg dieta)

	Caseína (C) (g/kg)	Caseína + 0,1 % colesterol (CCol) (g/kg)	Proteína de amaranto + 0,1 % colesterol (CCol) (g/kg)	Proteína de amaranto (g/kg)	Aproteico
Proteína do Amaranto ^a	0,00	0,00	263,16	263,16	0,00
Caseína ^b	251,83	251,83	0,00	0,00	0,00
Fósforo ^c	0,00	0,00	0,60	0,60	0,00
Lisina	0,00	0,00	3,50	3,50	0,00
Gordura coco	0,00	135,00	135,00	0,00	135,00
Óleo soja	150,00	15,00	15,00	150,00	15,00
Sacarose	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
Amido milho	450,17	449,17	433,74	434,74	702,00
Mistura de vitaminas	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Mistura de minerais	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00
Celulose	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
Cloreto colina	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Colesterol	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00
Peso Final	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00

^a 83,88 % de proteína

^b 83,29 % de proteína

^c Teores de fósforo da caseína e da proteína de amaranto foram considerados no cálculo de forma a deixar as rações isofosfóricas.

Os conteúdos de umidade, cinzas, lipídios e proteínas das dietas foram determinados de acordo com os métodos da AOAC (2005). O teor de carboidratos totais foi obtido por diferença. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

5.5.2 Experimento biológico

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

Foram utilizados 36 hamsters (*Mesocricetus auratus*), linhagem Golden Syrian, machos, recém-desmamados, com 21 dias de vida e padrão provenientes da ANILAB Animais de Laboratório Criação e Comércio LTDA, localizada em Paulínia, São Paulo.

Os animais foram alojados individualmente em caixas individuais com maravalha autoclavada em local com controle de umidade (55 %) e temperatura. A temperatura foi controlada entre 20 e 25°C, com janelas escurecidas para controle do ciclo de claro/escuro de 12 horas. As trocas das caixas e dos bebedouros foram realizadas uma vez por semana.

Figura 3: Animais mantidos em caixas individuais com maravalha autoclavada.

Após 4 dias de adaptação recebendo ração comercial e água *ad libitum*, 6 animais foram sorteados para determinação do perfil plasmático basal. O procedimento de eutanásia está descrito no item 5.5.3.

Os animais restantes foram distribuídos em 5 grupos com 6 animais cada, por amostragem casual sistemática,.

O grupo denominado Aprotéico (A) com 6 animais, foi utilizado no estudo para determinar a digestibilidade verdadeira da proteína.

Os 24 animais restantes foram distribuídos em 4 grupos de 6 animais. Cada grupo recebeu, por 21 dias, uma das seguintes rações experimentais:

1. **Dieta Experimental Caseína (Grupo C):** dieta cuja a fonte de proteína foi a caseína a 20 % do peso da dieta.
2. **Dieta Experimental Caseína Hipercolesterolemizante (Grupo Ccol):** dieta cuja a fonte protéica foi a caseína a 20 % do peso da dieta, adicionada de 0,1 % de colesterol e 13,5 % de gordura de coco.
3. **Dieta Experimental Isolado Protéico de Amaranto (Grupo I):** dieta cuja a fonte de proteína foi o isolado protéico de amaranto a 20 % do peso da dieta.
4. **Dieta Experimental Isolado Protéico de Amaranto (Grupo I):** dieta cuja a fonte de proteína foi o isolado protéico de amaranto a 20 % do peso da dieta, adicionada de 0,1 % de colesterol e 13,5 % de gordura de coco.

O fluxograma do ensaio principal se encontra na **Figura 4**.

A água foi oferecida *ad libitum* e a alimentação foi *pair feeding* com referência ao grupo que consumirá proteína de amaranto, para que ocorra uma equiparação da ingestão de nutrientes entre os grupos.

Figura 4: Fluxograma do desenho experimental.

5.5.3 Coleta de material biológico

As análises no plasma foram feitas pelo Laboratório de Controle de Qualidade Genética e Sanitária Animal, Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e pesquisa, Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina /USP.

A necessidade de jejum prévio à coleta de sangue e sacrifício em ensaios biológicos ainda é controversia. Alguns autores recomendam jejum de 10 hora, outros recomendam jejum por um curto período.

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.

Segundo Waner e Niska (1994), o jejum por período inferior a 8 horas não afeta os níveis plasmáticos de lipoproteínas e triacilgliceróis. Foi verificado por Weigand & Daggy (1991) que não há diferença no perfil das lipoproteínas plasmáticas em hamsters submetidos a 18 horas de jejum e aqueles que não foram submetidos ao jejum. Assim as coletas de sangue e o sacrifício dos animais foram realizados após jejum médio de 5 horas. Os animais foram anestesiados via intraperitoneal e tiveram o sangue coletado por punção cardíaca.

Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. A coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca (Figura 4). O sangue foi coletado em duplicata e acondicionado em microtubos contendo anticoagulante heparina, sendo logo em seguida centrifugado (1.000 x g, 15 minutos, 4°C) para obtenção do plasma (WRIGHT; SALTER, 1998).

Figura 5: Coleta de sangue por punção cardíaca.

O fígado foi retirado imediatamente após o sacrifício e pesado em balança analítica (modelo AX 200 - Shimadzu). O fragmento do lobo esquerdo foi cortado em pequenos pedaços de 100 a 200 mg, pesados, congelados em

nitrogênio líquido e armazenado em ultrafreezer a -80°C para posteriores análises da atividade da HMGCoA redutase, colesterol e lipídeos totais.

Para análise histológica foram utilizados porções do lobo direito do fígado, onde se localiza a vesícula biliar. Nesse caso, as partes foram lavadas com solução salina (9g NaCl/L^{-1}) e colocadas em formol 10 % para o preparo dos cortes.

Figura 6: Retirada do fígado dos animais.

5.5.4 Consumo Alimentar

A ingestão alimentar 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.

5.5.5 Ganho de peso e crescimento

Os animais foram pesados uma vez por semana, no mesmo horário, com o auxílio de uma balança semi analítica digital marca Filizola®, durante o período experimental para avaliar o ganho de peso e o crescimento. Foi calculado o Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) de cada dieta ofertada, dividindo-se o ganho de peso pela quantidade de ração consumida.

5.5.6 Digestibilidade verdadeira da proteína

A digestibilidade verdadeira foi calculada medindo-se a quantidade de nitrogênio ingerido pela dieta e a excretada nas fezes durante um período determinado durante o experimento. A perda metabólica foi determinada no material fecal do grupo aprotéico (McDONOUGH et al., 1990). Após o período de adaptação (3 dias), os animais foram alojados em gaiolas especiais para coleta de fezes (**Figura 7**) e o grupo denominado Aprotéico (n=6) foi alimentado com ração isenta de proteínas (**Tabela 4**), para avaliar o teor de nitrogênio excretado nas fezes, considerado como perda metabólica.

Tabela 4: Composição da ração aprotéica (g/kg)

Ingrediente	Ração (g/kg)
Amido de milho	603,0
Amido de milho dextrinizado	100,0
Óleo de soja	150,0
Celulose	50,0
Minerais	50,0
Vitaminas	35,0
Bitartarato de Colina	2,0

^a AIN 93G para roedores em crescimento (REEVES et al., 1993)

Figura 7: Gaiola adaptada para coleta de fezes

Após 3 dias de administração das rações experimentais, os animais foram pesados, as sobras das rações foram coletadas e pesadas e as fezes retidas foram coletadas e congeladas (-20 °C). Esse procedimento foi repetido durante 5 dias. Ao final, as fezes foram secas em estufa ventilada durante 24 horas a 100 °C. As fezes secas foram então pesadas, moídas e congeladas (-20 °C) para análise de nitrogênio através do método de micro- Kjeldhal. A digestibilidade verdadeira foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

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

onde, I representa o nitrogênio ingerido; F o nitrogênio excretado nas fezes pelo animal que se alimenta da ração experimental e Fk o nitrogênio excretado nas fezes do animal que se alimenta com ração isenta de proteína.

5.6 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 Universidade

de São Paulo (FMUSP).

O plasma obtido após a centrifugação do sangue dos animais foi imediatamente analisado e as concentrações de colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL) e triacilglicerol (TG) foram determinadas usando o sistema COBAS-MIRA (*Roche Diagnostics, USA*).

A fração de colesterol não-HDL (LDL-c + VLDL-c) foi calculada pela subtração do colesterol total (CT) com a fração HDL colesterol.

5.7 Análises do fígado

5.7.1 Colesterol

Para a determinação do colesterol total do fígado foi utilizado o método proposto por Katsanidis e Addis (1999) com modificações.

Foram homogeneizadas amostras de aproximadamente 200 mg de fígado em solução de saponificação, KOH 11g/100mL⁻¹, diluídas em etanol 55 % (v/v). Em seguida, a solução foi colocada em banho Maria por 15 minutos a 80°C. Após resfriamento, selecionou-se a parte orgânica para análise.

Para a quantificação foi utilizado HPLC da marca *Shimadzu LC-20AT*, com volume de injeção de 20µL. A fase móvel foi n-hexano/isopropanol (97:3 v/v), com fluxo isocrático de 1mL/min⁻¹. O detector utilizado foi UV/VIS com varredura, com leitura no comprimento de onda de 206nm. A quantificação foi realizada utilizando curva de calibração de colesterol padrão da *Sterolids Inc-USA*. O tempo de corrida foi de 8 minutos e as análises realizadas em triplicatas.

5.7.2 Lipídeos Totais

Para a obtenção do extrato lipídico foi utilizado o método de Bligh e Dyer (1959) com adaptações.

Amostras de 100 - 200 mg foram homogeneizadas e adicionadas de 500 µL de metanol, saponificadas com 100 µL solução de KOH (0,88 %) e adicionadas de 1000 µL de clorofórmio. A seguir, o extrato foi filtrado em papel qualitativo e lavado 3 vezes com 1000 µL de clorofórmio para extração dos lipídeos.

A quantidade de lipídeos extraídos foi determinada gravimetricamente.

5.7.3 Análise Histológica

Para a análise histológica, o fígado foi removido e preservado em formol tamponado em 10 % de solução fisiológica por 48 horas. Em seguida foram realizadas secções transversais. 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 (FROTA et al., 2008).

Para estudo morfométrico, as lâminas foram escaneadas e digitalizadas (3D HISTECH). A leitura das lâminas foi realizada por meio do *software Panoramic Viewer 3D HISTECH version 1.15.1*.

A avaliação histológica do fígado foi semi-quantitativa da presença de gordura vesical, de acordo com Frota et al. (2008).

O grau de inflamação (parenquimatosa e portal) dos tecidos também foi avaliado, segundo Brunt et al., (1999).

5.7.4 Análise da atividade da HMG-CoA redutase

A atividade da enzima HMGR nos fígados foi medida por meio do Kit CS 1090 da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA) de acordo com as instruções do fabricante com adaptações segundo Cong et al, 2012. A análise é baseada em espectrometria com absorvância de 340nm a 37°C, que representa a oxidação de NADPH pela HMGR, na presença do substrato HMG-CoA. A **Figura 8** esquematiza a reação de formação mevalonato a partir da HMG-CoA com o auxílio da enzima HMGR.

Figura 8: Representação esquemática da reação de atividade da HMG-CoA redutase

Fragmentos do tecido hepático dos animais foram homogeneizados em tampão (pH 7,5) contendo 100 mM de tampão de fosfato (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 em pH 7,5), 200 mM de KCl, 5 mM de EGTA, 5 mM de EDTA, 10 mM de DTT, 1 $\mu\text{g/ml}$ aprotinina e 0,5 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ de leupeptina (1:3 wt/vol) no gelo por 5 min., e centrifugados por mais 5 min. por 1000g em 4°C.

Os sobrenadantes foram coletados em Eppendorfs para dosagem de proteínas e determinação da atividade da enzima HMG CoA redutase no sobrenadante. Após o preparo das amostras, dosaram-se as proteínas pelo método de Lowry (1951).

Foram utilizados 20 μL do sobrenadante para a análise da atividade da HMGR em Leitor de Placas da marca Spectramax® M5 da Molecular Devices e o software Softmax® Pro5. A absorvância a 340 nm foi monitorizada em intervalos de tempo de 20 s para um tempo total de 10 min.

Uma unidade da atividade da HMG-CoA redutase corresponde a conversão de 1 μmol de NADPH a NADP formado por minuto a 37°C. Assim,

os resultados da atividade da HMG-CoA redutase foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ proteína ($\text{U}.\text{mg}^{-1}$ de proteína) (CONG et al, 2012).

Os resultados foram obtidos em triplicata.

5.8 Análises nas fezes

As fezes dos animais foram individualmente coletadas nos cinco últimos dias do experimento. Estas 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).

O conteúdo de colesterol foi analisado por cromatografia líquida, como descrito por Csallany et al. (1989).

Os ácidos biliares foram quantificados através de um kit comercial da marca Diazyme (San Diego, EUA).

As análises de colesterol e ácidos biliares foram realizadas em quadruplicatas.

5.9 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos em média, desvio-padrão e erro padrão. Para a comparação de médias entre grupos, foi realizada análise de variância (ANOVA). Quando encontrada diferença significativa foi aplicado o teste de comparação múltipla de Tukey, ao nível de 5 %.

Para análise dos graus de esteatose e inflamação hepática foi utilizado o teste χ -quadrado, ao nível de significância de 5 %.

O programa estatístico utilizado foi o SPSS 10.0 (USA). A construção dos gráficos foram realizadas no programa Excel (Microsoft).

5.10 Aspectos éticos

O protocolo experimental seguiu as normas do *Canadian Council on Animal Care* (OLFERT et al. 1993). Os procedimentos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Medicina Tropical da USP, sob número 2011/088 (Anexo 1).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização da Matéria - Prima

6.1.1 Composição centesimal

A **Tabela 5** apresenta os resultados obtidos na análise da composição centesimal do isolado protéico liofilizado do amaranto utilizado na produção das rações.

Tabela 5: Composição centesimal do isolado protéico liofilizado.

Amostra	Umidade (g/100g)	Cinzas (g/100g)	Proteínas (g/100g)	Lipídeos (g/100g)	Carboidratos[*] (g/100g)
Isolado					
Protéico de Amaranto	9,70	1,34 ± 0,12	83,88 ± 0,34	0,97 ± 0,07	4,11

Resultados expressos por média ± desvio padrão

* Carboidratos determinados por diferença

O teor de proteína encontrado na amostra de isolado protéico de amaranto está de acordo com a literatura, que varia entre 80 à 96 % (MENDONÇA 2009, SOARES 2008, VAZ 2010).

O desengorduramento foi eficaz, realizando a remoção quase total dos lipídeos presentes na farinha integral do amaranto. Outros autores consideram isolado protéico de amaranto a farinha com concentração entre 80 à 85% de proteína (SALCEDO-CHAVEZ et al., 2002; SCILINGO et al., 2002). Em comparação, a concentração mínima de proteína para um isolado protéico de soja é de 88 % (ABIA, 1991).

Com base no exposto conclui-se que o isolamento da proteína do amaranto foi eficaz e obteve-se uma proteína isolada com grau de pureza satisfatório.

Os resultados obtidos na análise da composição centesimal das dietas mostrado na **Tabela 6** abaixo, revelou que as formulações estavam de acordo com o planejado (Tabela 3), sendo isoprotéicas, isolipídicas e isocalóricas.

Tabela 6: Composição centesimal das dietas experimentais, representadas em g/100g, em base seca.

Componentes	Caseína (C)	Isolado Protéico (I)	Caseína Hiper (Ccol)	Isolado Protéico Hiper (Icol)
Umidade	2,33 ± 0,31 ^a	2,66 ± 0,28 ^b	2,89 ± 0,26 ^a	2,65 ± 0,31 ^b
Cinzas	2,98 ± 0,11 ^a	3,08 ± 0,54 ^a	3,12 ± 0,32 ^a	3,09 ± 0,29 ^a
Proteínas*	23,04 ± 0,43 ^a	22,87 ± 0,44 ^a	23,70 ± 0,38 ^a	22,53 ± 0,32 ^a
Lipídeos	16,97 ± 0,11 ^a	16,8 ± 0,54 ^a	16,21 ± 0,32 ^a	16,54 ± 0,31 ^a
Carboidratos**	57,01	57,25	56,97	57,84
Energia total (kcal/100g dieta)	472,93	471,68	468,57	470,34

* Fator de conversão= 6,25

** Calculado por diferença

Média ± desvio padrão

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa, ANOVA, Teste de Tukey (p<0,05)

As dietas experimentais dos grupos Icol e I receberam complementação com fósforo, afim de se tornarem isofosfórica. Também foi realizada a suplementação do aminoácido lisina nos grupos do amaranto, uma vez que a lisina foi o aminoácido limitante, como observado a seguir na **Tabela 7**. Desta maneira, a necessidades para roedores em fase de crescimento foi atingida (REEVES et al., 1993).

6.1.2 Rendimento do isolado protéico

Foram utilizados cerca de 3500g de farinha de amaranto desengordurada para a obtenção de 910g de isolado protéico liofilizado de amaranto. O rendimento foi de 26,3 %, próximo ao encontrado por Soares, 2008.

O método de isolamento utilizado foi o melhor dentre os testado por Mendonça 2006 e Martinez e Añón 1996, obtiveram por meio de diversos pHs de solubilização e precipitação, concentrações de isolado de amaranto entre 80 a 90 %, sendo a concentração de proteína encontrada no presente estudo de acordo com o que foi visto por esses autores.

6.1.2 Perfil de aminoácidos do isolado protéico de amaranto e da caseína

O perfil de aminoácidos obtido na análise do isolado protéico de amaranto foi comparado ao obtido por Vaz 2010, que também verificou o efeito hipocolesterolemizante da proteína do amaranto, e está demonstrado no **Tabela 7** abaixo.

Tabela 7: Perfil de aminoácidos da caseína e do isolado protéico do amaranto (g/100g de proteína) obtido pelo presente estudo e por VAZ, 2010.

Aminoácidos	Isolado protéico do amaranto ^a (g/100g de ptn)	Isolado protéico do amaranto ^b (g/100g de ptn)
Arginina	11,46	11,90
Histidina	2,60	3,29
Isoleucina	4,38	4,88
Leucina	6,59	6,66
Lisina	5,60	5,26
Treonina	4,49	3,98
Triptofano	1,30	1,43
Valina	3,66	3,94
Ácido aspártico	6,96	6,74
Ácido glutâmico	17,01	18,10
Serina	5,62	5,78
Glicina	6,24	6,49
Alanina	4,88	4,17
Prolina	5,47	5,53
Tirosina	4,80	4,22
Fenilalanina	3,70	4,99
Metionina	3,73	3,41
Cistina	1,82	1,23

^a isolado protéico obtido no presente estudo.

^b isolado protéico obtido por VAZ, 2010.

A **Tabela 7** demonstra que os resultados do perfil de aminoácidos encontrados neste estudo estão próximos ao encontrado no trabalho de Vaz, 2010. Também observa-se uma proximidade de resultados na relação lisina/arginina de 0,48 e 0,44, no presente estudo e no estudo de Vaz 2010, respectivamente. Esta relação sugere-se que seja um indicativo do efeito hipocolesterolemizante da proteína, uma vez que, quanto menor este valor, menor será a colesterolemia (SANCHEZ et al., 1988). Gorinstein et al (2001) determinaram o perfil de aminoácidos de amaranto (*A. Hypochondriacus*) e da

soja cultivada no Brasil e verificaram que a relação lisina/arginina foi de 0,53 para o amaranto e 0,65 para a soja.

A hipótese atual mais aceita é atribuída a presença de bioativos e a uma possível inibição da enzima HMG CoA redutase.

O teor de aminoácidos presentes no isolado protéico de amaranto foi comparável ao da recomendação da FAO/WHO para pré-escolares (1991) através do escore químico.

O escore químico de aminoácidos é determinado pela razão entre a quantidade de cada aminoácido presente na amostra e os valores recomendados pela FAO/WHO, 1991. Os resultados estão demonstrados na **Tabela 8** a seguir.

Tabela 8: Recomendação de aminoácido essências da FAO/WHO e escore químico de aminoácidos do isolado protéico.

Aminoácidos	Recomendação FAO/WHO (1991)	Escore Químico Isolado Protéico
Treonina	3,4	1,32
Metionina + Cistina	2,5	2,22
Valina	3,5	1,04
Isoleucina	2,8	1,56
Leucina	6,6	1,00
Fenilalanina + Tiosina	4,3	1,98
Lisina	5,8	0,94
Histidina	1,9	1,36
Triptofano	1,1	1,18

Nota: Valores em negrito representam o aminoácido limitante

Os resultados obtidos da avaliação do escore químico dos aminoácidos da proteína do amaranto permite apontar a lisina como aminoácido limitante, estando de acordo com Gorinstein et al, 2002, Soares 2008 e Vaz 2010. Porém dados de escore químico calculados por Mendonça et al. (2006), citam apenas a leucina como aminoácido limitante sendo observado também por Becker et al. 1981 e Duarte – Correa et al, 1986.

Essas diferenças podem estar associadas às características de solo e clima durante o cultivo do grão, espécies analisadas ou ainda à metodologia utilizada pelos autores.

6.2 Ensaio Biológico

6.2.1 Consumo alimentar e ganho de peso dos animais

A **Tabela 9** demonstra a média do ganho de peso, do consumo de ração e o CEA (%), dos animais dos grupos C, I, Ccol e Icol.

Tabela 9: Consumo alimentar, ganho de peso dos e Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) dos grupos.

Grupos	C	Ccol	I	Icol
Peso inicial (g)	42,63 ± 1,55 ^a	40,39 ± 2,20 ^a	43,39 ± 0,77 ^a	42,50 ± 1,85 ^a
Peso Final (g)	91,65 ± 3,01 ^a	88,66 ± 2,90 ^a	86,74 ± 3,07 ^a	86,93 ± 0,79 ^a
Consumo/dia (g)	7,18 ± 1,14 ^a	6,90 ± 1,10 ^a	7,02 ± 1,06 ^a	7,09 ± 1,17 ^a
Consumo total (g)	100,5 ± 5,78 ^a	96,60 ± 3,54 ^a	98,22 ± 4,75 ^a	99,3 ± 3,06 ^a
Ganho de peso (g)	49,01 ± 3,01 ^a	48,27 ± 2,42 ^a	43,34 ± 2,91 ^a	44,43 ± 1,77 ^a
CEA (%)	48,77	49,96	44,12	44,74

Os resultados estão expressos como média e erro padrão (n=6). Médias com letras iguais na mesma linha não diferem entre si. ANOVA, Tukey (p>0,05). C= ração com caseína; I = ração com proteína de amaranto; Ccol= ração com caseína + 0,1 % de colesterol; Icol= ração com proteína de amaranto + 0,1 % de colesterol.

Apesar de não significativo, observa-se um menor ganho de peso nos grupos alimentados com amaranto, mesmo empregando o *pair feeding*. Este resultado também foi verificado por outros autores (MENDONÇA et al., 2009, VAZ, 2010). Em relação ao consumo total e o consumo diário não houve diferença significativa entre os grupos, o que demonstra um consumo homogêneo entre os animais.

Esses resultados refletiram no CEA dos animais que consumiram proteína do amaranto (I e Icol), sendo menores nesses grupos em comparação com os que consumiram caseína (C e Ccol).

Mesmo sendo observado um menor CEA dos animais dos grupos alimentos com proteína do amaranto, é provável que este não tenha sido um fator responsável pelo efeito no colesterol sanguíneo dos animais. Outros estudos demonstram não haver nenhuma relação entre a resposta de crescimento devido a dieta e sua habilidade em influenciar os níveis corporais de colesterol.

A **Figura 9** mostra a evolução do ganho de peso dos animais no decorrer do ensaio biológico, observa-se que os animais foram ganhando peso de forma semelhante, que pode ser relacionado com a alimentação *pair feeding* oferecida aos animais. Com base no exposto, conclui-se as dietas que foram formuladas com proteína de amaranto tiveram uma tendência de menor ganho de peso nos animais alimentados por elas, embora o consumo total destes animais foi estaticamente simililar ao do grupo alimentado com caseína.

Figura 9: Ganho de peso (gramas) dos animais no decorrer do ensaio biológico.

Com base no exposto, conclui-se que não há diferença no crescimento dos animais em função da dieta, embora os animais alimentados pelas dietas

que foram formuladas com proteína de amaranto tenham apresentado uma tendência de menor ganho de peso.

6.2.2 Digestibilidade Protéica

É fundamental a avaliação da digestibilidade verdadeira da proteína, uma vez que uma menor digestibilidade poderia provocar alterações no trânsito intestinal e a maior excreção de esteróis neutros e sais biliares (McDONOUGH et al., 1990; MENDONÇA et al., 2009).

Estudos relatam que a proteína da soja pode ter menor digestibilidade que a caseína, o que levaria a fração não digerível a se ligar ao colesterol facilitando sua excreção, assim a absorção intestinal do colesterol seria reduzida, tendo um efeito semelhante ao de fibras (TERPSTRA et al., 1994).

Tabela 10: Digestibilidade das dietas

Grupo	Digestibilidade Protéica (%)
C	95,5 ± (0,34) ^a
Ccol	95,3 ± (0,41) ^a
I	97,4 ± (0,28) ^a
ICol	96,6 ± (0,29) ^a

Os resultados estão expressos como média e erro padrão (n=6). Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si. ANOVA, Tukey (p>0,05). C= ração com caseína; I = ração com proteína de amaranto; Ccol= ração com caseína + 0,1 % de colesterol; Icol= ração com proteína de amaranto + 0,1 % de colesterol.

A avaliação da digestibilidade do isolado protéico do amaranto e da caseína evidenciada na **Tabela 10** permitiu verificar que ambos possuem uma digestibilidade próxima, sem diferença significativa entre os grupos.

Pesquisas realizadas com caseína apontam um percentual entre 93% e 98,6 % de digestibilidade (IMERI et al., 1987, Mc DONOUGH et al., 1990), resultados próximos ao encontrado.

Mendonça et al., 2009, ao estudar a proteína de amaranto verificaram uma digestibilidade de 98,8 %, o que estaria próximo ao obtido neste estudo. Outros autores verificaram um percentual de digestibilidade do amaranto que varia entre 82-89 %. Esta diferença pode ser explicada pela eliminação nas etapas do isolamento de compostos que poderiam agir na redução da digestibilidade.

6.2.3 Perfil lipídico dos animais

A hipercolesterolemia em hamsters geralmente é induzida quando estes animais consomem dieta contendo ácidos graxos saturados e 0,1% de colesterol. (CHAU et al, 2008; CHENG et al., 2008; ZHANG et al., 2009). De acordo com Sirtori et al, 1993, a adição de colesterol à dieta, resulta em hipercolesterolemia moderada em algumas espécies, incluindo os hamsters.

Os resultados evidenciados na **Tabela 11** abaixo, estão de acordo com os de TERPSTRA (1996), MENDONÇA et al. (2009), VAZ (2010) FONTANARI et al (2012) que verificaram que o colesterol plasmático de animais alimentados com caseína ou proteína de origem vegetal aumenta na presença de colesterol dietético.

Tabela 11: Concentração plasmática de colesterol total (CT), frações de colesterol e triacilgliceróis (TG) dos animais (mg/dL)

Grupo	CT (mg/dL)	HDL ¹ (mg/dL)	não-HDL ² (mg/dL)	TG(mg/dL)
C	75,50 ± 4,19 ^{a,b}	34,67 ± 2,20 ^a	40,83 ± 2,43 ^a	80,83 ± 7,27 ^a
I	54,33 ± 3,80 ^a	29,50 ± 2,66 ^a	24,83 ± 3,22 ^a	66,17 ± 10,54 ^a
Ccol	124,00 ± 5,91 ^c	53,50 ± 3,98 ^b	71,16 ± 8,65 ^b	255,83 ± 28,46 ^b
Icol	84,67 ± 1,05 ^b	48,33 ± 1,11 ^b	36,33 ± 1,25 ^a	82,50 ± 9,74 ^a

Dados expressos como média (erro padrão). Letras iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem entre si, ANOVA, Tukey (p> 0,05). ¹HDL : lipoproteína de alta densidade; ²não HDL: obtido pela diferença entre CT e HDL. C= caseína; I = isolado protéico de amaranto; Ccol= caseína + 0,1 % de colesterol; Icol= isolado protéico de amaranto + 0,1 % de colesterol.

Os valores de referência de colesterol total para hamster, segundo laudo clínico emitido pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP, variam entre 40 a 94 mg/dL e o triglicerídeos de 125 a 214 mg/dL. De acordo com Nistor et al (1997), o teor considerado normal de colesterol total para hamster varia de 38 a 114 mg/dL .

A dieta com 13,5 % de gordura saturada e 0,1 % de colesterol foi capaz de induzir a hipercolesterolemia nos grupos Ccol e Icol, resultados que corroboram estudos prévios conduzidos com o mesmo delineamento experimental (FROTA et al., 2008; MENDONÇA et al., 2009; FONTANARI et al., 2012).

Como visualizado na **Tabela 11** a presença de colesterol na dieta Icol acentuou o efeito hipocolesterolemizante da proteína de amaranto em relação ao grupo Ccol. O grupo alimentado com dieta hipercolesterolêmica acrescida de amaranto obteve um teor de 46,4 % menor de colesterol, quando comparado com o grupo hipercolesterolemizado alimentado com caseína.

Resultado semelhante foi verificado por Sirtori et al 1984, que compararam o efeito hipocolesterolemizante da proteína da soja em relação à caseína, observou hamster alimentados com soja tiveram redução nas concentrações de colesterol total e triacilgliceróis em comparação aos animais alimentados com caseína.

Fontanari et al., (2012) observaram efeito hipocolesterolemizante do tremço (*Lupinus albus*) em hamsters alimentados com dieta rica em gordura saturada e colesterol. Os grupos que receberam a adição de farinha integral de tremço ou seu isolado protéico apresentaram redução do colesterol plasmático total de 16,88 % e 15,30 %, respectivamente.

O aumento de triglicerídeos no grupo que recebeu caseína com gordura saturada e colesterol foi significativamente maior que nos outros grupos, demonstrando o efeito protetor do isolado protéico do amaranto no grupo Icol que recebeu dieta hipercolesterolêmica e manteve suas concentrações de triglicerídeos iguais estatisticamente com os grupos com dieta normal.

Esses resultados corroboram estudo de QURESHI et al (1996) que avaliam o efeito da ingestão de amaranto no metabolismo dos lipídeos de animais e verificaram redução significativa de triglicerídeos.

Em estudo com hamster alimentados com proteínas de soja isenta de isoflavonas, Shukla et al (2007) verificaram redução nas concentrações de triglicerídeos plasmáticos sem modificar a concentração de colesterol total.

Ao observar as concentrações plasmáticas de HDL e colesterol não HDL, nota-se que somente o grupo que recebeu dieta hipercolesterolêmica e caseína apresentam valores superiores e que diferem estatisticamente entre os grupos. O grupo alimentado dieta hipercolesterolêmica acrescida de proteína de amaranto manteve suas concentrações semelhante estatisticamente aos grupos com dieta normal.

A ingestão da dieta com fonte protéica de amaranto apresentou valores menores de CT, HDL, colesterol não HDL e TG em comparação aos outros grupos, embora não significativos esses resultados reiteram o papel hipocolesterolemizante do amaranto.

Mendonça et al (2009) estudaram o efeito hipocolesterolemizante da proteína do amaranto em hamsters e verificaram uma redução de 48 % no colesterol total e 56 % do colesterol não HDL dos animais alimentados com dieta hipercolesterolêmica com proteína do amaranto.

Vaz (2010) em seu estudo sobre a ingestão de proteína do amaranto e seu efeito no metabolismo do colesterol também observou a redução significativa do colesterol total e triglicerídeos nos animais alimentados com amaranto.

O consumo de proteína de amaranto promoveu uma redução das concentrações de colesterol plasmáticos. Esse efeito pode estar associado a formação de peptídeos bioativos que agem reduzindo a síntese de colesterol hepático possivelmente via enzima HMG CoA redutase.

6.2.4 Ácidos biliares e colesterol nas fezes

O mecanismo mais provável que explica a redução do colesterol das proteínas vegetais é o aumento da excreção de ácidos biliares e colesterol nas fezes.

Fukui et al 2004, estudando o efeito hipocolesterolemizante da proteína de soja, observaram que a proteína de soja liga-se aos ácidos biliares, podendo explicar em parte o efeito hipocolesterolemizante das proteínas vegetais.

O aumento da excreção de colesterol e ácidos biliares nas fezes foram relatados para dietas contendo proteínas vegetais e com componentes bioativos e fitoesteróis (MARTINS et al. 2005)

No presente trabalho, a proteína do amaranto oferecida junta à gordura de coco e colesterol não produziu um aumento na excreção de ácidos biliares e colesterol nas fezes. Essa divergência também foi observado por FROTA 2008 e FONTANARI 2012, que analisaram isolado protéico de feijão e de tremçoço respectivamente, sugerindo que o efeito da hipocolesterolemizante da proteína isolada pode ser consequência da inibição da síntese de colesterol.

Os resultados das análises de excreção nas fezes de colesterol e ácidos biliares estão representados na **Tabela 12** a seguir.

Tabela 12: Excreção fecal de colesterol e ácidos biliares

Grupo	Colesterol (g/100g fezes)	Ácidos Biliares (μ mol/g fezes)
C	0,18 $\pm$ 0,05 ^a	1,760 $\pm$ 0,08 ^a
I	0,17 $\pm$ 0,01 ^a	1,864 $\pm$ 0,07 ^a
Ccol	0,11 $\pm$ 0,03 ^a	1,362 $\pm$ 0,17 ^b
Icol	0,20 $\pm$ 0,04 ^a	1,788 $\pm$ 0,04 ^a

Os resultados estão expressos como média e erro padrão (n=6). Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si. ANOVA, Tukey (p>0,05). C= ração com caseína; I = ração com proteína de amaranto; Ccol= ração com caseína + 0,1 % de colesterol; Icol= ração com proteína de amaranto + 0,1 % de colesterol.

Não foi encontrado nenhuma diferença significativa na excreção de colesterol total e ácidos biliares entre os grupos que receberam isolado de amaranto, o que corrobora o mecanismo sugerido por Frota, 2008.

Somente o grupo alimentado com dieta hipercolesterolêmica e caseína apresentou uma menor excreção de ácidos biliares, diferente e significativa em relação aos grupos C, I e Icol. Isto já era o esperado, pois uma menor eliminação e o concomitante aumento na captação de ácidos biliares, resulta em hipercolesterolemia. Uma vez que o aumento de chegada de colesterol no fígado leva a uma diminuição da síntese de ácidos biliares a partir do colesterol, provocando seu acúmulo e diminuição da síntese de receptores de LDL.

6.2.5 Colesterol e lipídeos no fígado

Hamsters alimentados com colesterol, produzem acúmulo lipídeos no fígado, o que leva a um aumento do peso do órgão. Na **Figura 10** a seguir, estão apresentados os pesos dos fígados dos animais (g/100g de animal). Os animais em que a dieta era constituída de proteína isolada do amaranto acrescida ou não de 0,1 % de colesterol apresentaram pesos de fígado inferiores aos animais alimentados com caseína.

Oliveira et al., 2011, relataram que o alto teor de lipídeos na dieta de hamsters induz ao aumento de peso dos fígados, chegando a ficar até duas vezes mais pesados que os animais alimentados com dieta isenta de colesterol e gordura de coco, aumentando também as quantidades hepáticas de colesterol esterificado, fosfolipídeos e triacilgliceróis.

Figura 10: Média de peso do fígado dos animais dos diferentes grupos.

Os resultados estão expressos como média e erro padrão (n=6). Barras com letras iguais não diferem entre si. ANOVA, Tukey ($p > 0,05$). C= ração com caseína; I = ração com proteína de amaranto; Ccol= ração com caseína + 0,1 % de colesterol; Icol= ração com proteína de amaranto + 0,1 % de colesterol.

Na **Tabela 13** estão apresentados os resultados dos teores de colesterol e lipídeos totais hepáticos ajustados pelo peso do fígado.

Tabela 13: Teores de lipídios totais e colesterol nos fígados dos animais.

Grupo	Lipídios totais (g/100 g fígado)	Colesterol (g/100g fígado)
C	2,23 ± 0,14 ^a	0,40 ± 0,03 ^a
I	1,98 ± 0,38 ^a	0,23 ± 0,01 ^b
Ccol	3,94 ± 0,18 ^b	1,21 ± 0,01 ^c
Icol	2,07 ± 0,28 ^a	0,37 ± 0,02 ^a

Os resultados estão expressos como média e erro padrão (n=6). Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si. ANOVA, Tukey ($p > 0,05$). C= ração com caseína; I = ração com proteína de amaranto; Ccol= ração com caseína + 0,1 % de colesterol; Icol= ração com proteína de amaranto + 0,1 % de colesterol.

Foi verificada uma diferença significativa no depósito de gordura hepática entre os animais alimentados com ração Ccol e Icol. Animais

alimentados com dietas I e C também apresentaram diferença significativa na concentração de colesterol hepático, sendo o grupo alimentado com isolado protéico de amaranto apresentou os menores valores.

Estudos com a proteína da soja demonstram um efeito protetor contra o depósito de lipídeos no fígado, o que promove uma redução dos efeitos deletérios causados pelo excesso de gordura hepática (ASCENCIO et al, 2004).

Vaz 2010, no seu estudo do metabolismo lipídico de ratos alimentados com proteína da amaranto, observou um menor acúmulo de colesterol de 48 % no grupo com dieta hipercolesterolemizada acrescida de isolado protéico em relação ao grupo com alimentação hipercolesterolemizada e caseína. No presente estudo essa relação foi de 47 %, sendo bem próximo do relatado por Vaz 2010.

Mendonça et al., 2009 também demonstrou menor acúmulo de colesterol e lipídeos hepáticos em hamster alimentado com proteína isolada de amaranto. Desta forma é possível que a proteína do amaranto apresente o mesmo efeito protetor.

6.2.6 Atividade da HMG CoA redutase no fígado

Pesquisas têm sido realizadas com a tentativa de elucidar os mecanismos pelos quais as proteínas vegetais poderiam alterar o metabolismo do colesterol. Em revisão sobre esses mecanismo, Potter 1995 cita dentre as possibilidades, o efeito dessas proteínas no metabolismo hepático do colesterol, afetando a atividade da enzima HMG-CoA redutase.

No presente estudo, foi verificado significativamente uma menor atividade da enzima HMG-CoA redutase nos animais alimentados com isolado de amaranto e colesterol (grupo Icol) quando comparados com os animais alimentados com caseína e colesterol (grupo Ccol), como observado na **Figura 11**.

Figura 11: Atividade enzimática da 3-hidroxi-3metilglutaril-coenzima A redutase em tecido hepático nos diferentes grupos experimentais. Médias com letras iguais na mesma não diferem entre si. ANOVA, Tukey ($p > 0,05$). C= ração com caseína; I = ração com proteína de amaranto; Ccol= ração com caseína + 0,1 % de colesterol; Icol= ração com proteína de amaranto + 0,1 % de colesterol. Resultados expressos como média e erro padrão ($n=6$).

Em estudo com uma pasta produzida a partir proteína isolada de duas variedades de feijões, Nakamura et al., 2009, observaram uma redução na atividade da HMG-CoA redutase de ratos alimentados com a referida pasta.

O efeito da proteína do amaranto na atividade da HMG-CoA redutase verificado neste estudo, auxilia na investigação dos achados de outros pesquisadores que observaram efeito hipocolesterolemizante da proteína de fonte vegetal (FROTA et al, 2008; MENDONÇA et al, 2009; VAZ, 2010; FONTANARI, 2012) e tornam mais forte a hipótese levantada por eles de que a proteína isolada age reduzindo a síntese de colesterol, possivelmente devido a formação de bioativos que atuam na expressão das proteínas envolvidas na síntese de colesterol. Os mecanismos dessa regulação ainda não estão claros e precisam ser investigados em pesquisas futuras.

Na **Tabela 14** a baixo, encontram-se os resultados do delta A que foi calculado a partir da diferença entre a absorbância final e inicial na

determinação da atividade da HMG-CoA redutase, de acordo com o kit CS 1090 da Sigma-Aldrich.

Tabela 14: Delta A da atividade da enzima HMG-CoA redutase

Grupo	Delta A ($\Delta A_{340}/\text{min}_{\text{Final}} - \Delta A_{340}/\text{min}_{\text{Inicial}}$)
C	$-0,23 \pm 0,03^a$
I	$-0,18 \pm 0,09^b$
Ccol	$-0,21 \pm 0,07^c$
Icol	$-0,11 \pm 0,04^b$

Os resultados estão expressos como média e erro padrão (n=6). Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si. ANOVA, Tukey ($p>0,05$). C= ração com caseína; I = ração com proteína de amaranto; Ccol= ração com caseína + 0,1 % de colesterol; Icol= ração com proteína de amaranto + 0,1 % de colesterol.

A partir dos dados demonstrados, nota-se que a atividade da HMG-CoA redutase foi significativamente diferente entre o grupo Ccol e os outros grupos. Ele apresentou um delta A 48 % maior que o grupo Icol. Observa-se também o grupo I foi estatisticamente igual ao grupo Icol e ambos diferem com o grupo Ccol, podendo ser uma evidência do papel da proteína do amaranto na regulação da atividade da HMG-CoA.

Alguns autores têm mostrado os efeitos da dieta na modulação de genes codificadores de enzimas da via da síntese de colesterol, com particular destaque para a HMG-CoA redutase, evidenciando o efeito hipocolesterolemizante da proteína da soja (IRITANI et al., 1996; YAMAMOTO et al., 2004; CORCOS et al., 2005; TOVAR et al., 2005; TAKAO et al., 2005; FEIGE et al., 2006; TORRES et al., 2006).

Vaz 2010, em seu estudo com ratos alimentados com proteína isolada do amaranto, verificou que a ingestão de dieta formulada com isolado protéico de amaranto contendo 1 % de colesterol apresenta uma tendência a reduzir de forma significativa a expressão da proteína nuclear *sterol regulatory element binding protein* (SBREP-2) nos fígados de ratos, responsável por ativar alguns genes necessários para a síntese de colesterol, como o gene que codifica para a HMG-CoA redutase.

Estudos em ratos, alimentados com isolado protéico de soja, mostraram seu efeito na redução da expressão da HMG-CoA redutase, modulados pelo fator de transcrição SREBP-2 (TOVAR et al., 2005; SHUKLA et al., 2007).

Por outro lado, Macarulla et al. (2001), observaram que as leguminosas aumentam o anabolismo de colesterol por causa da redução da absorção de ácidos biliares e colesterol, e consequentemente aumentando a atividade da HMG-CoA redutase no fígado.

Martins et al. (2005), encontraram duas vezes maior a atividade de HMG-CoA redutase em porcos que receberam dieta contendo ervilha intacta comparado ao grupo que recebeu caseína.

Os resultados do presente estudo, evidenciaram uma redução significativa da atividade da enzima HMG-CoA redutase após a ingestão de dieta contendo isolado protéico de amaranto e indicam que essa proteína tem um potencial efeito de redução da síntese de colesterol. Essa descoberta explicaria o efeito de redução dos níveis de colesterol dos animais alimentados com essa proteína. Entretanto, estudos mais detalhados devem ser realizados para determinar os eventos relacionados com essa diminuição para confirmar essa hipótese.

6.2.6 Análises histológicas no fígado

O acúmulo de lipídeos em tecidos impede o metabolismo celular normal, o dano causado por esse acúmulo é chamado de lipotoxicidade, no fígado causa a esteatose hepática conhecida como doença do fígado gorduroso não alcoólico.

Estudos demonstram que a proteína vegetal realiza um efeito protetor nos fígados, prevenindo o acúmulo hepático de ácido graxos e triglicerídeos. Tovar et al. (2005), investigaram se o consumo de proteína de soja comparado à caseína poderia prevenir o aparecimento de anormalidades nos lipídeos hepáticos de ratos, como resultado observou-se que os ratos que consumiam a proteína de soja apresentaram menor acúmulo de lipídeos hepáticos.

A avaliação histológica do fígado incluiu a análise semi-quantitativa da presença de gordura vesical. As lâminas foram codificadas e analisadas por um patologista sem conhecimento prévio dos tratamentos aos quais os animais haviam sido submetidos.

Para se verificar o grau de esteatose dos fígados foi utilizada uma escala de 0 a 4+, de acordo com FROTA *et al*, (2008), conforme descrito na **Tabela 15**.

Tabela 15: Escores de esteatose hepática e significados clínicos.

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

O estudo histológico mostrou que nos animais dos grupos experimentais alimentados com caseína apresentavam grandes áreas esbranquiçadas do parênquima hepático, ilustrando a presença de vacuolização celular intensa e difusa. A vacuolização celular sugere a deposição de lipídios, e portanto doença hepática gordurosa não alcoólica.

O teste do χ -quadrado revelou uma relação de dependência entre a variável das dietas dos animais alimentados com caseína (grupo C e Ccol) e nível de esteatose hepática, os quais apresentaram maiores escores.

De acordo com a **Figura 12** observa-se que a esteatose se encontra em escore 4+ (difusa e intensa) no animal alimentado com caseína e 0,1% de colesterol, conforme orientação das setas apontando para as deposições de glóbulos de gorduras com diferentes tamanhos dentro das células parenquimais, evidenciando o resultado estatístico observado.

Figura 12: Fotomicrografias de secções de 5 μm de espessura do fígado coradas com HE, ilustrando presença de vacuolização (grau 4+) no parênquima hepático em hamster do Grupo Caseína Hipercolesterolêmica. Aumentos de 40x.

As setas da **Figura 13** abaixo, mostram presença de hepatócitos de diversos tamanhos e binucleados (setas) caracterizando um processo de regeneração devido a apoptose.

Figura 13: Fotomicrografias de secções de 5 μm de espessura do fígado coradas com HE, ilustrando presença de hepatócito binucleado (grau 3+) no parênquima hepático em hamster do Grupo Caseína Hipercolesterolêmica. Aumentos de 40x.

Segundo Oliveira et al, 2011, o consumo de ácidos graxos saturados e colesterol em hamsters promove aumento da atividade da ACAT, responsável pela esterificação do colesterol intracelular, o que acarreta em aumento de até 28% no tamanho de seus hepatócitos.

O grupo Icol apresentou em média esteatose focal e em alguns casos a ausência de esteatose. A **Figura 14** seguir mostra a distribuição percentual dos grupos experimentais de acordo com o grau de esteatose.

Figura 14: Distribuição percentual (%) dos grupos de acordo com o grau de esteatose (0 à 4+).

Observa-se que 75% dos animais do grupo I não apresentaram esteatose e 60% do grupo Icol apresentaram esteatose focal, enquanto que o grupo CCOL apresentou 70% dos animais com esteatose de forma difusa e intensa

Sabe-se que alguns tipos de proteínas vegetais são capazes de modular o acúmulo de triacilgliceróis nos hepatócitos. O mecanismo está relacionado

com a diminuição da expressão dos genes da SREBP 2, enzima envolvida na síntese hepática de ácidos graxos e triacilgliceróis (SPIELMANN et al., 2007).

Estudo realizado por Frota et al., (2008) verificaram que a proteína isolada de feijão caupi apresentaram efeito hepatoprotetor, resultado similar ao de Fontanari et al., (2012), que também observaram este mesmo efeito para a proteína isolada do tremoço.

Não se observou alterações histológicas no tecido hepático pertencente aos animais do grupo I, apresentado uma morfologia normal do parênquima hepático, com hepatócitos intactos, sinusóides e espaços porta. O grupo Icol apresentou pequenos focos de esteatose quando comparado com o grupo que se alimentou de caseína.

A inflamação do parênquima hepático foram classificadas de acordo com Brunt et al., (1999) e os escores encontram-se descritos na **Tabela 16**.

Tabela 16: Escores de inflamação e significados clínicos.

Escore	Significado clínico
0	Ausência de inflamação
1+	< 2 focos por campo de 20x
2+	2-4 focos por campo de 20x
3+	> 4 focos por campo de 20x

A análise histológica das amostras de fígado dos animais pertencentes aos grupos C e Ccol mostrou alterações histopatológicas semelhantes. No parênquima hepático observaram-se vários graus de alteração lobular e portal, incluindo uma um infiltrado inflamatório polimorfonuclear principalmente portal, (**Figura 15**). Na maioria dos casos, os hepatócitos apresentavam diferentes tamanhos e núcleos picnóticos (**Figura 16**). Por vezes, foram observados vacúolos citoplasmáticos de grandes dimensões e limites bem definidos que distorcem o hepatócito.

Figura 15: Fotomicrografias de secções de 5 μm de espessura do fígado coradas com HE, evidenciando a presença de foco inflamatório (grau 3+) no parênquima hepático em hamster do Grupo Caseína + 0,1% colesterol. Aumentos de 20x.

Figura 16: Fotomicrografias de secções de 5 μm de espessura do fígado coradas com HE, evidenciando a presença de picnose (grau 4+) no parênquima hepático em hamster do Grupo Caseína + 0,1% colesterol. Aumentos de 20x.

A presença de triacilgliceróis em excesso no interior dos hepatócitos é resultado da ingestão prolongada de dieta hiperlipídica pelos animais pode ter provocado a infiltração de inflamatórias.

O efeito benefício do amaranto no acúmulo da gordura do fígado não parece estar relacionado com o peso dos animais, uma vez que o ganho de peso foi estatisticamente igual para os grupos. A ingestão alimentar também foi similar e as dietas foram idênticas no teor de lipídeos, carboidratos, minerais e vitaminas, diferindo apenas na fonte protéica e nas concentrações de colesterol.

O menor peso relativo do fígado dos animais que receberam dieta a base de amaranto comparado com àqueles alimentados com caseína pode ser explicada pela redução no acúmulo de gordura neste órgão.

Pode-se concluir que no presente estudo a adição de isolado protéico de amaranto às dietas reduz o acúmulo de gordura hepática em hamster hipercolesterolemizados, sugerindo efeito hepatoprotetor quanto à deposição de lipídeos hepáticos.

7. CONCLUSÃO

Com este estudo foi observado pela primeira vez que a ingestão de dieta contendo proteína de amaranto adicionado de 0,1% de colesterol e 13,5% ácidos graxos tende a reduzir de forma significativa a atividade da enzima HMG-CoA redutase.

A proteína de amaranto pode ser considerada um aliado na redução dos agravos gerados pela dislipidemia, uma vez que reduziu significativamente os níveis de colesterol plasmático e gordura hepática, além de ser demonstrado seu efeito na redução da atividade da enzima HMG-CoA redutase dos animais hipercolesterolemizados que se alimentaram com proteína de amaranto.

Esses efeitos podem estar associados à formação de peptídeos bioativos, que provavelmente agem reduzindo a expressão e atividade da HMG CoA redutase, contudo esses mecanismos ainda não foram esclarecidos, sendo necessários estudos futuros.

Acredita-se que o consumo e a produção do amaranto pela população deve ser estimulado, como alternativa para diversificar a dieta e agricultura do país

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. **Compêndio da legislação de alimentos**. São Paulo, v.2, p.7-33, 1991.

AMAYA-FARFAN, J.; MARCILIO, R.; SPEHAR, C.R. Deveria o Brasil investir em novos grãos para a sua alimentação? A proposta do amaranto (*Amaranthus* sp.). **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 12, p. 47-56, 2005.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 17th ed. Gaithersburg, Md.: AOAC, 2005.

ASCENCIO, C et al. Soy protein affects serum insulin and hepatic SBREP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. **J Nutr**. v 134, p. 522-5229, 2004.

AZAMBUJA, M. I. R. Impacto Econômico dos Casos de Doença Cardiovascular Grave no Brasil: uma Estimativa Baseada em Dados Secundários. **Arq Bras Cardiol**. v. 91, n.3, p. 163-171, 2008.

BADGER T.M, et al. Soy Protein Isolate Reduces Hepatosteatosi in Yellow Avy/a Mice Without Altering Coat Color Phenotype. **J Exo Biol Med**, v. 233 N. 10, p. 124- 127, 2008.

BEAGLEHOLE, R.; SARACCI, R.; PANICO, S. Cardiovascular diseases: causes, surveillance and prevention. **Int. J. Epidemiol.**, v.30, n. 1, p. 1-4, oct. 2008.

BLIGH E.G, DYER W.J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. **Can J Biochem Physiol**. v. 37, n.8, p. 911-917, 1959.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Saúde Brasil: uma análise da situação de saúde**, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Único de Saúde. **Indicadores e dados básicos**. [homepage na internet] Brasil, 2010. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2010/c08.def> [Acesso em 18 de julho de 2012].

BRESSANI R. The proteins of grain amaranth **Food Rev Int**, v. 5, n.1, p. 13-16, 1989.

BRUNT, EM; JANNEY, CG; DI BISCEGLIE, AM; NEUSCHWANDER- TETRI, BA; BACON, BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal of grading and staging the histological lesions. **Am J Gastroenterol**. 2467-2474, 1999.

CHATUVERDI A, et al. Hypocholesterolemic effect of amaranth seeds (*Amaranthus esculatus*). **Plant Food Human Nutr**, v. 44, p. 63- 70, 1993.

CONG, R. et al. Maternal low-protein diet causes epigenetic deregulation of HMGCR and CYP7 α 1 in the liver of weaning piglets. **Jornal of Nutr Biochem.**, 2012.

CORCOS, J. L, et al. Hepatic farnesyl diphosphate synthase expression is suppressed by polyunsaturated fatty acids. **Biochem J.**, v. 385, p. 787-94, 2005.

CSALLANY, A. S., et al. HPLC method for quantification of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues. **Journal of Food Lipids**, v. 24, n. 7, p. 645-651, 1989.

CZERWIŃSKI J, et al. Oat (*Avena sativa* L.) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) meals positively affect plasma lipid profile in rats fed cholesterol-containing diets. **The J Nutr Biochem**,v. 15, n.10, p. 622-629, 2004.

DANIELS, T.F, et al. Lipoproteins, cholesterol homeostasis, and cardiac health. **Int. J Biol Sci.**, v. 5, p. 474-488, 2009.

DIETSCHY JM. Theoretical considerations of what regulates low-density-lipoprotein and high-density-lipoprotein cholesterol. **Am J Clin Nutr**, v.65, p.1281-89, 1997.

DORFMAN, S. E.; SMITH, D. E.; OSGOOD, D. P.; LICHTENSTEIN, A. H. Study of Diet-Induced Changes in lipoprotein Metabolism in two Strains of Golden-Syrian Hamsters 1,2. **J. Nutr.**, v. 133, p. 4183-4188, 2003.

DUARTE-CORREA, A. Aminoacid composition of some *Amaranthus* sp grain proteins and its fractions. **Arch Latinoam. Nutr.** v 26, p. 466-476, 1986.

DURANTI M, et. al. The subunit from soybean 7S globulin lowers plasma lipids and upregulates liver VLDL receptors in rats fed a hypercholesterolemic diet. **J Nutr**, v. 134, p. 1334 – 1339, 2004.

DZIUBA J, et al. Computer-aided characteristics of proteins as potential precursors of bioactive peptides. **Polimery**, v. 48, n.1, p. 50–53; 2003.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Amaranto: Opção para diversificar a agricultura e os alimentos**. Embrapa, Cerrados Platina – DF, 2007.

ESCUADERO, N. L, et. al. Influence of Protein Concentrate from *Amaranthus cruentus* seedd on the Lipid Metabolism. **Exper Biol Med**. v. 231, n. 1, p.50-59, 2006.

FEIGE J. N, et al. From molecular action to physiological outputs: Peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. **Prog Lip Res**. v. 45, n.2, p.120 -159, 2006.

FONTANARI, G.G; BATISTUTI, JP; CRUZ, RJ; SALDIVA, PHN; ARÊAS, JAG. Cholesterol-lowering effect of whole lupin (*Lupinus albus*) seed and its protein isolate. **Food Chemistry**. 1521-1526, 2012.

FROTA K.M.G et al. Cholesterol-Lowering Properties of Whole Cowpea Seed and Its Protein Isolate in Hamsters. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, p.235-240, 2008.

FUKUI K, et al. Ethanol washing does not attenuate the hypocholesterolemic potential of soy protein. **Nutrition**. v. 20, p. 984-90, 2004.

GAMEL, T.H., et al. Characterization of Amaranth Seed Oils. **Journal of Food Lipids**, v 14, p. 323-334, 2007.

GLEW, R.H. Metabolismo de ipídeos II. Vias do metabolismo de lipídeos especiais. In: DEVLIN, T.M., coord. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. cap.18, p.683-724. São Paulo: Blucher, 2007.

GORINSTEIN S, et al. Computacional analysis of the amino acid residue sequences of amaranth and some other proteins. **Biosc Biotech Biochem.** v. 62, n.10, p. 1845-1851, 1998.

GRAJETA H. Effects of amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds on lipid metabolism in rats. **Bromatol Chemi Toksykol.** V. 30, p. 25-32, 1997.

GURR, M.I.; FRAYN, K.N.; HARWOOD, J.L. Lipid transport. **Lipid biochemistry**.cap.5, p.170-214. 5.ed. Oxford: Blackwell Science, 2002.

HUI, D.Y.; HOWLES, P.N. Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine. **Seminars in Cell e Developmental Biology**, v.16, p.183–192, 2005.

IMERI A, et al. Variabilidad genética, y correlaciones entre rendimiento, tamaño del grano, composición química y calidad de la proteína de 25 variedades de amaranto (*Amaranthus caudatus*). **Arch Latinoam Nutr.** v. 37, p.132-146, 1987.

IRITANI N, et al. Soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in wistar fatty rats. **J Nutr**, v. 126, p. 380-388, 1996.

KITTS DD, WEILER K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Curr Pharm Des.** v. 9, n.16, p. 1309-1323; 2003.

KATSANIDS E, ADDIS PB. Novel HPLC analysis of tocopherols, tocotrienols and cholesterol in tissue. **Free Rad Biol Med.** v. 27, p. 1137-1140, 1999.

KAYASHITA J, et al. Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats because of its low digestibility. **J Nutr**, v. 127, p. 1935-1400, 1997.

KORHONEN H, PIHLANTO A. Food-derived bioactive peptides—opportunities for designing future foods. **Curr Pharm Des**, v. 9, n.16, p. 1297–1308, 2003.

KRIS-ETHERTON, P. et al. AHA scientific statement: summary of the Scientific Conference on Dietary Fatty Acids and Cardiovascular Health. Conference summary from the Nutrition Committee of the American Heart Association.

Journal of Nutrition, v.131, n.4, p.1322-6, apr., 2001.

KULLAK-UBLICK, G.A et al. Hepatic transport of bile acids. **Sem. Liver Disease**. v. 20, p. 273-292, 2000.

KWITEROVICH P. O. The metabolic pathways of high-density lipoprotein low-density lipoprotein and triglycerides: A current review. **Am J Cardiol**, v. 21, p. 86-94, 2000.

LEHMANN JW. Case history of grain amaranth as an alternative crop. **Cereal Foods World**, v 41, n.5, p. 399-410, 1996.

LEESON CPM, et al. Cholesterol and arterial distensibility in the first decade of life. **Rev. Circulation**, v.101, p.1533-1538, 2000.

LOCK, A et al. Butter naturally enriched in conjugated linoleic acid and vaccenic acid alters tissue fatty acids and improves the plasma lipoprotein profile cholesterol-fed hamsters. **J. Nutr.**, v. 135, p. 1934-1939, 2005.

LOTEMBERG AMP. Importância da Gordura Alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, p. 595-607, 2008.

LOVATI M.R, ET AL.Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. **J Nutr**, v. 130, p. 2543–2549, 2000.

LOWRY, O. H et al. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **Jornal . Biol. Chem.** v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, K. LEE, M. PASTEL, S. Dietary cholesterol absorption; more than just bile. **Trend in End Met**, v. 12, p. 314-320, 2001.

MACARULLA, M. T. et al. Effects of the whole seed and a protein isolate of faba bean (*Vicia faba*) on the cholesterol metabolism of hypercholesterolaemic rats. B. **J. Nutr.**, v. 85, p. 607-614, 2001.

MADANI S, ET AL. Highly Purified Soybean Protein Is Not Hypocholesterolemic in Rats but Stimulates Cholesterol Synthesis and Excretion and Reduces Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthesis. **Biochem Mol Biol of Nutr.**, v. 2, p. 1084-1091, 1998.

MANN, J. I. Diet and risk of coronary heart disease and type II diabetes. **Lancet**, v.360, p.783-9, 2002.

MALTA D. C, et al. Construção da vigilância e prevenção das doenças crônicas não trasmissíveis no contexto do sis- tema único de saúde. **Epidemiol Serv Saúde**, v. 15, p. 47-64, 2006.

MARSOLA, A.P.Z.C et al. Análise dos Custos de Medicamentos no Tratamento das Dislipidemias em Ribeirão Preto. **Rev Bras Cardiol.** v. 25, p. 313-321, 2012.

MARTINEZ, E. N; AÑON, M.C. Composition and characterization of amaranth protein isolates. An eletrophoretic and calorimetric study. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v 44, p.2523-30, 1996.

MARTINS, JM; RIOTTOT, M; ABREU, MC; LANÇA, MJ; VIEGAS- CRESPO, *et al.* Dietary raw peas (*Pisum sativum* L.) reduce plasma total Ana LDL cholesterol and hepatic esterified cholesterol in intact and ileorectal anastomosed pigs fed cholesterol rich diets. **Nutriente Metabolism.** 3305-3312, 2004.

MCDONOUGH FE, et al. In vivo assay for true protein digestibility: collaborative study. **J Assoc Anal Chem**, v. 73, n.5, p.801- 805, 1990.

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

MENDONÇA, S. et al. Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. **Journal Food Chemistry**, v. 116, n. 3, p. 738-742, 2009.

MONTEROS C.J, et al. Iniap alegria primera variedad mejorada de amaranto para la sierra ecuatoriana. In: **Produccion y procesamiento de quinua em Ecuador**, 1998.

MORIYAMA T, et al. Soybean p-conglycinin diet suppresses serum triglyceride level in normal and genetically obese mice by induction of beta-oxidation, downregulation os fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. **Biosci Biotechnol Biochem.** v.68, n.2, p. 352 – 359, 2004.

NAGAOKA S, et al. Soy protein peptic hidrolysed with bound phospholipds decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rat and Caco-2 cells. **J Nutr**, v. 129, p.1725-1730, 1999.

NAKAMURA, Y; YABE, K; SHIMADA, K; SASAKI, K; Han, KH; OKADA, T; *et al.* Effect of fermented bean paste on serum lipids in rats fed a cholesterol-free diet. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v.73, n.11, 2506-2512, 2009.

NISTOR et al., The hyperlipidemic hamster as a model of experimental atherosclerosis. **Atherosclerosis**. v. 68, p. 159-173, 1997.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Laboratory Animal**. 4th Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. 192p, 1995.

OLFERT E. **Guide to the Care and Use of Experimental Animal**. 2 ed., v.1, Canadian Council, 1993.

OLIVEIRA, T.V et al. Impact of high cholesterol intake on tissue cholesterol content and lipid transfers to high-density lipoprotein. **Nutrition**. p.713-718, 2011.

PEDERSEN B, et al. Nutritive value of grain (*Amaranthus caudatus* L.): 1. Protein and minerals of raw and processed grain. **Plant Foods Hum Nutr**. v. 36, p. 309-311, 1987.

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

POTTER, S. M. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. **J. Nutr**. v 125, p. 606 -611, 1995.

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

RAMOS, A. T. et al. Uso de *Passiflora edulis f. flavicarpa* na redução do colesterol. **Braz J. Pharmacogn**. v.17, n.4, p. 592-597, 2007.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; TAHEY, G. C. 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-76 A rodent diet. **Journal Nutrition**, v.123, p.1939-1951, 1993.

SALCEDO – CHAVEZ, B et al. Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds. *J Agric Food Chem*. v. 50, p. 6515-6520, 2002.

SANCHEZ, A. et al. Cholesterol affects the lysine/arginine ratio in rabbits after initial early growth. **Arch Latinoam Nutr**, v.28, p. 229-238, 1988.

SCHRAMM, J. M. A et al. Transição epidemiológica e o estudo da carga de doença no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 9, n. 4, p. 897-908, 2004.

SHUKLA A, et al. Isoflavone- poor soy protein alters the lipid metabolism of rats by SREBP-mediated down-regulation of hepatic genes. **J Nutr Biochem**. v.18, p.313–321, 2007.

SILVA-SÁNCHEZ C, et al. Bioactive Peptides in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed. **J Agric Food Chem**. v. 56, p. 1233–1240, 2008.

SIRTORI, C.R. et al. Soybean protein diet and plasma cholesterol: from therapy to molecular mechanisms. **Ann New York Acad Scien**. v. 676, p. 189-201, 1993.

SOARES R.A.M. **Identificação de peptídeos hipocolesterolemizantes do isolado protéico do grão de amaranto**. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SPHEAR, C. R; TEIXEIRA, D.L. Caracterização agrônômica de acessos em três espécies de amaranto no Bioma Cerrado. **Embrapa Cerrados** - Planaltina, DF, 20p, 2004.

SUGANO M, et al. Cholesterol lowering activity of various undigested fractions of soybean protein in rats. **J Nutr**, v. 120, p. 977-985, 1990.

SVIRIDOV D, NESTEL P. 2002. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. **Atherosclerosis**. v. 161, p 245–254, 2002.

TAKAO T, et al. Hypocholesterolemic effect of protein isolated from Quinoa (*Chenopodium Quinoa* WILLD) seeds. **Food Sci Technol Res**. v.11, n.2, p.161-167, 2005.

TERPSTRA, A. H. M.; HERMUS, R. J. J.; WEST, C. E. The role of dietary protein in cholesterol metabolism. **World Revise Nutrition Dietetic**, v.42, p. 1-5, 1991.

TERPSTRA AHM, LAITINEN L, STUCCHI AF, NICOLOSI RJ. The effect of semipurified diets containing two levels (20% and 40%) of Esther casein or soybean protein isolate and concentrate in plasma lipids in hamsters. **Nutr Res.**; v. 14, n. 6, p. 885-895, 1994.

TORRES, N. et al. Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implications in diseases by lipid disorders. **J Nutr Bioch**, v.17, p. 365-372, 2006.

TOSI E. A., et al. Dietary fiber obtained from amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) grain by diferential milling. **Food Chem**. v. 101, p. 586-587, 2001.

TOVAR AR, et al. Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hiperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats. **J Lip Res**, v. 46, n.9, p.1823-1832, 2005.

VAZ, LCMA. **Efeito da ingestão de proteína de amaranto no metabolismo do colesterol em ratos**. São Paulo, 2010. [dissertação- Faculdade de Saúde Pública/USP].

WANER, T.; NISK, A. The influence of fasting on blood glucose, triglycerides, cholesterol and alkaline phosphatase in rats. **Vet. Clin. Pathol**. v. 23, p. 78-80, 1994.

WEINGARD, K. W., DAGGY, B. P. Quantification of high-density-lipoprotein cholesterol in plasma from hamsters by differential precipitation. **Clin. Chem.**, v 36, p. 575-579, 1991.

WHITE JA, HART RJ, FRY JC. An evaluation of the waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **J Auto Chem.** v. 8, n.4, p. 170- 177, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases.** Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. Geneva, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 2008: reducing risks, promoting healthy life.** Geneva, 2008.

WRIGHT, S. M.; SALTER, A.M. Effects of soybean on plasma cholesterol and bile acid excretion in hamster. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 119b, n. 2, p. 247-254, 1998.

YAMAMOTO, T; ET AL. SREBP-1 Interacts with Hepatocyte Nuclear Factor-4 and Interferes with PGC-1 Recruitment to Suppress Hepatic Gluconeogenic Genes. **J Biol Chem.** v.279, n.13, p. 12027-12035, 2004.

YOSHIDA, R. A. et al . Cirurgia aorto-ilíaca videolaparoscópica para tratamento de isquemia crítica de membros: relato do primeiro caso no Brasil. **J. vasc. bras.**, v. 8, n. 4, 2009.

ZHANG Z, et. al. Coosing hamster but not rats as a model for studing plasma cholesterol-lowering activity of functional foods. **Mol Nutr Food Reser.** v. 53, p. 921-930, 2009.

ZHONG F, et al. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. **Food Res Intern**, v. 40, n.6, p. 661-667, 2007.

9. ANEXOS

Anexo 1 – Carta de aceite do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11) 3061-7066/8650 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e
3062-2174
e-mail: cpq-imt@usp.br

São Paulo, 23 de fevereiro de 2011.

Ilmo (a)

Dr. José Alfredo Gomes Arêas

(aos cuidados de Thais Rezende Suraty)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical 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 **CPE-IMT 2011/088** e intitulado "Efeito da proteína de amarantho (*amaranthus cruentus* L. BRS Alegria) na atividade enzimática hepática da HMGC α redutase e seu papel no metabolismo lipídico, sob a sua responsabilidade.

Atenciosamente,

Dr. Paulo Cotrim

Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMTSP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais do IMTSP