

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Efeito da ingestão de proteína de amaranto no
metabolismo do colesterol em ratos**

Lilian Carolina Martins de Assis Vaz

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Nutrição em Saúde
Pública para obtenção do título de Mestre
em Ciências.**

**Área de concentração: Nutrição em Saúde
Pública**

**Orientador: Prof. Dr. José Alfredo Gomes
Arêas**

São Paulo

2010

Efeito da ingestão de proteína de amaranto no metabolismo do colesterol em ratos

Lilian Carolina Martins de Assis Vaz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição em Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas

São Paulo

2010

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

Dedico esta conquista à minha mãe, Sandra; minha avó, Terezinha; minha filha, Olívia e ao meu marido, João Paulo, dos quais recebi apoio incondicional durante o período de desenvolvimento deste trabalho

Agradecimentos

Ao professor Dr. José Alfredo Gomes Arêas, por acreditar na realização desse trabalho, mesmo com as adversidades enfrentadas.

Ao professor Dr. Marcelo Macedo Rogero, pela ajuda valiosa no decorrer deste trabalho, pelas sugestões oferecidas desde o início e pelas palavras amigas nos momentos de angústia.

Aos professores Dr. Silvio José Valadão Vicente e Dr. Marcelo Macedo Rogero, membros da comissão julgadora, pelo precioso tempo dedicado à revisão deste trabalho e pelas importantes sugestões que muito contribuíram para finalização do mesmo.

Ao professor Dr. Julio Tirapegui, por ter permitido a realização das análises de *Western-blotting* nas dependências do seu laboratório.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro que possibilitou a execução deste estudo.

À todas as colegas e, mais que isso, amigas que frequentam o laboratório. Cada uma ofereceu auxílio a seu jeito. Sou grata a todas pelo apoio e pela amizade.

Às alunas de Iniciação Científica Ludmila, Natália e Nara pelo auxílio no isolamento da proteína de amarantho.

Ao Sr. Bastos, pelo auxílio em todos os momentos solicitados.

A Olívia, minha linda filha, que mesmo antes de dar seus primeiros passos soube aceitar minhas escolhas.

Ao meu marido João Paulo, pelo apoio incondicional em todos os momentos, pelo ombro amigo e pelo auxílio em todas as fases deste trabalho.

A meu irmão Fabricio e à Priscila Alves, por cuidarem tão bem da Olívia no início do Mestrado, especialmente no período de cumprimento dos créditos em disciplinas.

A Adriana Sabino Sotolani, pela amizade inestimável, pelo auxílio nas etapas fundamentais desse trabalho e pela força durante o período de amamentação da Olívia.

A meu irmão Luis Fabiano, pela ajuda na revisão do texto e pelos cuidados com minha filha, sempre que possível.

À minha família, cuja ajuda inestimável tornou possível a realização deste trabalho. Meu especial agradecimento à minha mãe Sandra e a minha avó Terezinha, que mesmo diante das adversidades nunca me desampararam e sempre acreditaram no meu potencial.

Aos meus queridos colegas Luila, Rosana, Karen, Vanessa e Demétrius, pela amizade e ajuda com análises fundamentais para o término do trabalho.

Ao meu querido colega Lucas Pantaleão pelas dicas e pelo auxílio na análise de *Western-blotting*.

A todas as pessoas que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

A Deus, que sempre ilumina minha vida e me deu forças para concluir este trabalho.

Resumo

Vaz L C M A. Efeito da ingestão de proteína de amaranto no metabolismo do colesterol em ratos [Dissertação de Mestrado em Nutrição em Saúde Pública] São Paulo. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2010.

Introdução – As doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morte no Brasil e no mundo. Evidências epidemiológicas e clínicas estabelecem associação entre dieta, dislipidemia e aumento do risco de morte. O consumo de proteína isolada de amaranto tem efeito hipocolesterolemizante e por isso pode reduzir, de modo significativo, os fatores de risco das doenças cardiovasculares. **Objetivo** – Avaliar o efeito da ingestão do isolado protéico de amaranto, no perfil de lipoproteínas plasmáticas e na expressão de proteínas relacionadas à modulação da síntese do colesterol hepático. **Métodos** – Vinte e oito ratos *Wistar (Ratus norvegicus)* foram distribuídos em quatro grupos e receberam dietas diferenciadas pela fonte protéica. Os grupos experimentais (I e Icol) receberam dieta com 20% de proteína de amaranto e os grupos controle (C e Ccol) receberam dieta com 20% de caseína. As dietas “col” apresentavam 1% de colesterol. Ao grupo controle foi fornecida a média da quantidade de ração ingerida pelos grupos experimentais I e Icol (controle *pair feeding*). Para determinar o efeito da ingestão das dietas no metabolismo do colesterol, foram avaliadas as concentrações plasmáticas de triacilgliceróis, colesterol total e HDL-c, e as concentrações hepáticas de colesterol e lipídios totais. O efeito da ingestão da proteína de amaranto na regulação das vias de síntese do colesterol hepático foi investigado pela avaliação da expressão das proteínas nucleares: receptor X hepático α (LXR α), receptor ativado por proliferadores de peroxissoma α (PPAR α) e proteína ligadora do elemento regulado por esterol 2 (SREBP-2). **Resultados** – A dieta Icol promoveu menor concentração plasmática de colesterol total e triacilgliceróis (36% e 47%, respectivamente) em comparação ao grupo Ccol. Observou-se, no fígado dos animais alimentados com dieta contendo proteína isolada de

amaranto (I e Icol), menor concentração de lipídios totais e de fração colesterol. A digestibilidade entre as dietas Icol e Ccol não apresentou diferença significativa, enquanto a da dieta I foi menor que a da dieta C. Não foi observada alteração na expressão das proteínas PPAR α e LXR α em nenhum dos grupos. Uma redução significativa na expressão da proteína SREBP-2 foi verificada no fígado dos ratos que receberam dieta Icol em relação aos do grupo Ccol. **Conclusão** – A ingestão de dieta Icol reduz de forma significativa a expressão do SREBP-2 no fígado de ratos. Essa redução sugere que o efeito hipocolesterolemizante promovido pela proteína de amaranto pode estar relacionado ao metabolismo endógeno do colesterol. Esse efeito independe da ação dos fatores de transcrição PPAR α e LXR α e pode estar associado à formação de peptídeos bioativos, muito embora os mecanismos não estejam claros. O isolado protéico apresenta efeito hepatoprotetor por diminuir o acúmulo de lipídios hepáticos mesmo quando o colesterol está presente na dieta.

Descritores: amaranto, isolado protéico, colesterol.

Abstract

Vaz L C M A. Effect of amaranth protein isolate intake on cholesterol metabolism in rats. [MSc Dissertation] São Paulo. Health Public College of the University of São Paulo; 2010.

Introduction - Cardiovascular diseases are among the most important causes of death in Brazil and around the world. Epidemiologic and clinical evidences associate diet, dyslipidemia, and increased risk of death. Consumption of amaranth protein isolate has a hypocholesterolemic effect that may reduce, significantly, cardiovascular disease risk factors. **Objective** – To assess the effect of amaranth protein isolate intake on plasma lipoprotein profile and on expression of proteins that modulate hepatic cholesterol synthesis. **Methods** – Twenty eight *Wistar* rats were distributed in four groups and fed on different protein diets. The experimental groups (I e Icol) diets contained 20% amaranth protein and the control groups (C e Ccol) diets contained 20% casein. The “col” diets also contained 1% cholesterol. It was offered to the control group the mean of the amount of food consumed by the experimental groups (pair feeding control). In order to determine the effects of dietary intake on cholesterol metabolism, plasma total cholesterol, triglycerides, and HDL-c levels were assessed, as well as hepatic total lipids and cholesterol levels. The effect of amaranth protein on pathways of cholesterol synthesis was investigated by liver X receptors α (LXR α), peroxisome proliferator activated receptors α (PPAR α) and sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) expressions. **Results**– Rats fed on Icol diet showed lower concentrations of plasma total cholesterol and triglycerides (36% and 47%, respectively) than those observed in Ccol diet group. A lower cholesterol and hepatic lipid concentration was observed in rats fed on amaranth protein isolate (I e Icol). There was no significant difference shown between the digestibility of the Icol and Ccol diets, although the digestibility of the I diet was lower than the digestibility of the C diet. No change was noticed in PPAR α and LXR α expression in any of the studied groups. There was a significantly down-regulation in SREBP-2 expression in the liver of rats

fed on Icol diet when compared to those fed on Ccol diet. **Conclusions** – The consumption of Icol diet reduces significantly SREBP-2 expression in the liver of rats. This decrease in SREBP-2 expression suggests that the hypocholesterolemic effect of the amaranth protein may be related to the endogenous metabolism of cholesterol. This effect does not depend on the transcription factors PPAR α and LXR α , and may be associated with bioactive peptides formation, although the mechanisms involved are not yet clear. The protein isolate has a hepatic-protective effect because it lowers hepatic lipid accumulation even when cholesterol was present in the diet.

Keywords: amaranth, protein isolate, cholesterol.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 O AMARANTO	19
1.2 EFEITO HIPOCOLESTEROLEMIZANTE DO AMARANTO	20
1.3 ASPECTOS GERAIS DO METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS	24
1.4 HOMEOSTASE DO COLESTEROL	27
1.5 DIETA E PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA REGULAÇÃO DA SÍNTESE DO COLESTEROL.....	34
2. OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVO GERAL.....	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 MATÉRIA-PRIMA	38
3.2 OBTENÇÃO DO ISOLADO PROTÉICO	38
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	41
3.4 ENSAIO BIOLÓGICO	44
3.5 ANÁLISES NO PLASMA	54
3.6 ANÁLISES NO FÍGADO	55
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
3.8 ASPECTOS ÉTICOS.....	58

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	59
4.2 ENSAIO BIOLÓGICO	68
5. CONCLUSÕES	93
6. REFERÊNCIAS	93
7. ANEXO	108
8. Currículo lattes	110

Lista de Quadros

Quadro 1	Composição estimada e valor nutritivo das rações experimentais	46
Quadro 2	Composição da ração aprotéica (g/kg).	53
Quadro 3	Composição centesimal das amostras analisadas	59
Quadro 4	Teor de aminoácidos da caseína, do isolado protéico de amaranto seco e desengordurado (g/100g de proteína).	61
Quadro 5	Recomendação de aminoácidos essenciais da FAO/WHO e escore químico de aminoácidos do isolado protéico.	63
Quadro 6	Peso molecular (kDa) e densidade ótica (DO) da farinha de amaranto integral, do isolado protéico e da farinha desengordurada	65
Quadro 7	Digestibilidade da caseína e da proteína de amaranto com e sem a adição de 1% de colesterol	67
Quadro 8	Ganho de peso e consumo total das rações após 21 dias de administração das rações ad libitum	70
Quadro 9	Ganho de peso, consumo e coeficiente de eficiência Alimentar (CEA) dos grupos I, Icol, C e Ccol	73

Quadro 10	Concentração plasmática de colesterol total (CT), frações do colesterol e triacilgliceróis (TG) dos animais (mg/dl).	76
Quadro 11	Colesterol e lipídios totais do fígado dos animais dos grupos C, I, Ccol e Icol	80

Lista de Figuras

Figura 1	Regulação intracelular da expressão do gene LDLR e da HMG-CoA redutase pelo SREBP-2	30
Figura 2	Fluxograma de obtenção do isolado protéico da farinha de amaranto.	40
Figura 3	Fluxograma do ensaio piloto.	48
Figura 4	Fluxograma do ensaio principal.	50
Figura 5	Gaiola adaptada para coleta de fezes	53
Figura 6	Gel de Eletroforese SDS-PAGE 10% e perfil densiométrico.	64
Figura 7	Relação peso do fígado/peso corporal dos animais dos grupos C, I, Ccol e lcol.	79
Figura 8	Porções do lobo do fígado dos ratos. 1: C; 2: I; 3: Ccol; 4:lcol.	79
Figura 9	Expressão do PPAR α (52 kDa)	83
Figura 10	Expressão do LXR α (76kDa)	84
Figura 11	Expressão da forma madura do nSREBP-2 (68kDa)	86

Lista de Abreviaturas e Siglas

apoB-48 – apolipoproteína B-48

apoB-100 – apolipoproteína B-100

C – ração cuja fonte protéica é a caseína

Ccol – ração cuja fonte protéica é a caseína, com a adição de 1% de colesterol

DAC - doença arterial coronariana

DCNT – doenças crônicas não transmissíveis

DCV – doenças cardiovasculares

HDL – lipoproteína de alta densidade

HMG-CoA redutase – 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase

I – ração cuja fonte protéica é o isolado protéico de amaranto

Icol - ração cuja fonte protéica é o isolado protéico de amaranto, com a adição de 1% de colesterol

IDL – lipoproteína de densidade intermediária

IPA – isolado protéico de amaranto

LDL – lipoproteína de baixa densidade

LDLR – receptor de lipoproteínas de baixa densidade

LH – lípase hepática

LLP – lípase de lipoproteína

LXR α – receptor X hepático α

nSREBP-2 – forma madura da proteína ligadora do elemento regulado por esteróis 2

PPAR α – receptor de proliferadores de peroxissoma α

SREBP – proteína ligadora do elemento regulado por esteróis

TG – triacilgliceróis

TRC – transporte reverso do colesterol

VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade

VLDLR – receptor de lipoproteína de muito baixa densidade

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos dois últimos séculos, a revolução tecnológica e industrial, com consequências econômicas e sociais, resultou em uma mudança drástica do perfil de morbimortalidade da população, com grande predomínio de doenças e mortes decorrentes de doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT), dentre elas as doenças cardiovasculares (DCV) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Segundo expectativa da Organização Mundial de Saúde, nos próximos anos um aumento de 17% nas mortes por DCNT deve ocorrer, metade das quais serão devidas a DCV (WHO, 2007).

O acúmulo de evidências epidemiológicas e clínicas estabelece claramente a associação entre dieta, dislipidemia e aumento do risco de morte. A aterosclerose coronariana é uma das principais DCV e está diretamente relacionada com a concentração de colesterol e de triacilgliceróis no sangue (FIETZ e SALGADO 1999; AKOSAH 2000).

Estratégias para a prevenção das DCNT são bastante amplas e passíveis de serem alcançadas, sendo que o combate aos fatores de risco associados deve ser o alvo da prevenção. Segundo a WHO/FAO (2002), cerca de 80% das DCV poderiam ser evitadas por mudanças na dieta e estilo de vida, que figuram entre os fatores de risco modificáveis.

A dieta tem grande impacto sob as doenças do coração. A recomendação de dieta com baixa concentração de gordura saturada e colesterol auxilia a reduzir os riscos de DCV (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 1998).

O colesterol desempenha importantes funções nos seres vivos por ser um componente estrutural da membrana celular que influencia sua fluidez e ativação enzimática, e por ser um precursor do colesterciferol, de hormônios esteróides e de ácidos biliares. Entretanto, o colesterol em excesso é prejudicial à saúde por ser um fator de risco para o desenvolvimento das DCV (SANTOS, 2001). Portanto, as células tendem a manter a concentração de colesterol sobre rigoroso controle.

No organismo humano, o controle da concentração sérica de colesterol ocorre principalmente através da regulação da captação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que são as principais transportadoras do colesterol endógeno (DIETSCHY, 1997). Essa fração contribui significativamente para a formação da placa de ateroma, enquanto as lipoproteínas de alta densidade (HDL) exercem efeito protetor para as artérias (BROWN et al., 1981). Sendo assim, o risco para o desenvolvimento da aterosclerose está relacionado tanto a elevadas concentrações de LDL, como a baixas concentrações da fração HDL (SMITH et al., 2004).

Ensaio clínicos salientam que uma dieta adequada – rica em leguminosas, grãos integrais, frutas e hortaliças, peixes e com baixo teor de lipídios – está associada à menor incidência de DCNT, incluindo as DCV (PRICE e FOWKES, 1997; IQBAL, 2008). Estudos destacam o papel de intervenções alimentares no sentido de reduzir ou prevenir de forma significativa o aparecimento destas doenças (LINDSTÖM et al., 2003; LORGERIL e SALEN, 2006).

Alimentos como a soja e o amaranto podem colaborar para o controle

das concentrações plasmáticas de colesterol. A ação de alimentos de origem vegetal na diminuição da concentração plasmática de colesterol em ratos, hamsters e coelhos é relatada na literatura, e testes em humanos mostram redução significativa nos lipídios plasmáticos (BAUM et al., 1998; LINDSTÖM et al., 2003; CZERWIŃSKI et al. 2004; ROSELL et al., 2004; TOVAR et al., 2005; TAKAO et al., 2005; LORGERIL e SALEN 2006; TORRES et al., 2006; FROTA et al., 2008; MENDONÇA et al., 2009).

1.1 O AMARANTO

O amaranto é um pseudocereal da classe das dicotiledôneas e família das amarantáceas, cultivado especialmente em países andinos da América do Sul. Dentre suas características, destaca-se a resistência a condições climáticas drásticas, adaptando-se a qualquer solo. O aproveitamento da planta é integral, podendo ser consumidos desde suas folhas até os grãos (SILVA-SÁNCHEZ et al., 2008). As diferentes espécies apresentam-se morfológicamente semelhantes, com sementes pequenas e em forma lenticular (1 a 1,5 mm de diâmetro e massa de 0,6 a 1,0 mg) (SAUNDERS e BECKER, 1984).

Em 1980, o amaranto foi reconhecido pela Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos como uma das culturas mais promissoras para alimentar a humanidade, devido ao seu elevado valor nutricional e potencial agrônômico (SILVA-SÁNCHEZ et al., 2008). Desde então, o interesse por essa planta tem aumentado em todo o mundo.

O amaranto apresenta, em média, 15-16% de proteína, 7-8% de lipídios, 50-60% de amido (PEDERSEN et al., 1987) e 14,2% de fibra alimentar (TOSI et al., 2001). 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).

Em revisão, Bressani (1989) relatou que o perfil de aminoácidos do amaranto é similar entre diferentes espécies. 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).

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 compostos presentes em sua composição (CHATUVERDI et al., 1993; GRAJETA, 1997; PLATE e ARÊAS, 2002; CZERWIŃSKI et al., 2004; MENDONÇA et al., 2009).

1.2 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; QURESHI, 1996; 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).

Plate e Arêas (2002) verificaram que componentes do grão livres de lipídios e, conseqüentemente, das demais substâncias lipossolúveis, eram suficientes para responder pelo efeito hipocolesterolemizante.

Mendonça et al. (2009) evidenciaram que a proteína de amaranto, isenta de outros componentes com potencial ação hipocolesterolemizante, é capaz de reduzir em 48% o colesterol total e em 57% o teor plasmático de colesterol não-HDL de animais previamente hipercolesterolemizados por meio de dieta rica em caseína.

Diversos estudos têm sido conduzidos no sentido de elucidar o mecanismo pelo qual as proteínas de origem vegetal agem na redução da concentração plasmática de colesterol (TOVAR et al., 2005; TAKAO et al., 2005; ESCUDERO et al., 2006; SHUKLA et al., 2007).

O efeito da proteína da soja em reduzir o colesterol poderia correlacionar-se com as diferenças no perfil de aminoácido entre a proteína da soja 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, e a caseína, 2,5 (KAYASHITA et al., 1997; MENDONÇA, 2006). Sugere-se que, quanto menor esta proporção, menor a colesterolemia.

Segundo Sanchez (1991), a composição de aminoácidos da proteína de soja pode ter efeitos endócrinos, por atuar na regulação da razão insulina/glucagon. No fígado, a insulina e o glucagon modulam a expressão e a atividade de enzimas relacionadas com a síntese ou captação do colesterol, bem como a síntese de ácidos graxos (SARWAR e RATNAYAKE, 2000; TORRES et al., 2006)

Entretanto, 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 conseqüentemente 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 a proteína intacta. O referido autor enfatiza a teoria de que parte das proteínas de soja não é totalmente degradada pelas enzimas digestivas e resulta 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, aumentando sua excreção.

Mendonça et al. (2009) sugeriram que a formação de peptídeos bioativos, produzidos pela digestão incompleta da proteína, poderia afetar não só a absorção de colesterol intestinal mas também agir no metabolismo endógeno, atuando 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, dentre outros (DZIUBA et al., 2003). Uma vez absorvidos, esses fragmentos teriam uma ação reguladora, com atividades tipicamente hormonais (KORHONEN e PIHLANTO, 2003; KITTS e WEILER, 2003), podendo exercer diversas funções biológicas por interação com células receptoras, regulando enzimas

ou interferindo em ciclos celulares (DZIUBA et al., 2003).

Os peptídeos bioativos provenientes da dieta são formados por pequenos fragmentos de proteínas ou 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, determinando a redução da concentração de colesterol. Contudo, esse mecanismo ainda não foi elucidado (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).

1.3 ASPECTOS GERAIS DO METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS.

A homeostase do colesterol no compartimento plasmático e nos

tecidos é regulada por processos complexos que envolvem a síntese e secreção de lipoproteínas, além da atividade de receptores celulares específicos para as lipoproteínas, de enzimas lipolíticas e de proteínas de transferência de lipídeos (LOTTEMBERG, 2008; DANIELS et al., 2009).

O colesterol circulante necessita de uma vesícula de transporte para protegê-lo da natureza aquosa do plasma, visto que é um lipídio. As lipoproteínas são micelas responsáveis por transportar várias proteínas e lipídios no sistema vascular (DANIELS et al., 2009).

No plasma, as lipoproteínas sofrem a ação de enzimas e proteínas de transferência e, por esta razão, são continuamente remodeladas durante o trânsito no compartimento plasmático. As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), as LDL e as 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).

Os QM são lipoproteínas ricas em triacilgliceróis formadas, nas células da mucosa intestinal, de acordo com a ingestão de lipídios oriundos da dieta (triacilgliceróis, colesterol e fosfolípidos) e apolipoproteína (apo) B48. Os quilomícrons recém sintetizados são secretados nos vasos linfáticos e chegam à circulação sanguínea através do ducto torácico. Na circulação, adquirem apoC e apoE, e sofrem a ação da enzima lípase de lipoproteína (LLP), responsável por catalisar a hidrólise de triacilgliceróis e promover a liberação de ácidos graxos para os tecidos (LOTTEMBERG, 2008)

Assim, o QM é reduzido, ao mesmo tempo em que há 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 ao LDL receptor (LRP) que reconhecem e se ligam a apoE. Essa captação também pode ser realizada pelo receptor α 2 macroglobulina do fígado e pela proteína análoga ao receptor de colesterol (LRP1) (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 para o fígado, o que caracteriza o transporte reverso de colesterol (TRC) (LOTTEMBERG, 2008; DANIELS et al., 2009). Por seu efeito na redução do acúmulo de colesterol nas paredes das artérias, o TRC é um dos mecanismos que reduz o desenvolvimento da aterosclerose (SVIRIDOV e NESTEL, 2002; DANIELS et al., 2009).

O TRC tem início com a captação de colesterol livre (CL) dos tecidos periféricos por meio das pré-HDL ou HDL nascente, ricas em fosfolipídios e em CL (KWITEROVICH, 2000; LOTTEMBERG, 2008).

O colesterol das células periféricas é captado pelas HDL nas quais é esterificado pela ação da enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT). Com isso, as HDL tornam-se menos densas, maiores e mais esféricas, dando origem às HDL3 (SVIRIDOV e NESTEL, 2006; LOTTEMBERG,

2008). Estas lipoproteínas são removidas da circulação através do receptor hepático SR-BI (*scavenger receptor type BI*), possibilitando sua reutilização ou excreção hepática sob a forma de ácidos biliares (ACTON et al., 1996).

Os lipídios captados pelo fígado são, em parte, secretados para a circulação sob a forma de VLDL, que sofrerão a ação da LLP e da lipase hepática (LH), transformando-se em remanescentes (IDL) e, em LDL rica em CE (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).

O aumento do conteúdo intracelular de colesterol induz menor síntese dos LDLR. Concomitantemente, a atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), enzima-chave na biossíntese do colesterol, é reduzida. Em situações de baixa concentração de colesterol ocorre o oposto, de forma a manter o conteúdo de colesterol intracelular constante (LOTTEMBERG, 2008).

1.4 HOMEOSTASE DO COLESTEROL

Em células animais, a homeostase dos lipídios é regulada por um mecanismo de retroalimentação, que regula a transcrição de genes

envolvidos na síntese e na captação de lipídios. Os fatores de transcrição que regulam e coordenam a expressão desses genes são denominados proteína ligadora do elemento regulado por esteróis - *SREBP* (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*). Identificados por Brown e Goldstein, em 1997, esses fatores de transcrição permitiram a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na homeostase do colesterol celular (SHIMOMURA et al., 1997).

Três isoformas de SREBP são conhecidas (SREBP-1a, SREBP-1c e SREBP-2), sendo a SREBP-2 responsável por ativar, preferencialmente, o gene que codifica o LDLR e vários genes necessários para a síntese de colesterol, como o que codifica a HMG-CoA redutase (BROWN e GOLDSTEIN, 1997; YAMAMOTO et al., 2004; CORCOS et al., 2005). Embora a isoforma SREBP-1a também ative as vias de biossíntese de colesterol e de ácidos graxos, ela está presente no fígado em baixa quantidade (SHIMOMURA et al., 1997).

No fígado, as SREBP regulam a produção de triacilgliceróis e de colesterol, que são secretados para o plasma sob a forma de lipoproteínas e também excretados na bile como micelas (HORTON et al., 2002; YAMAMOTO et al., 2004)

O SREBP-2 é sintetizado como precursor inativo associado às membranas do retículo endoplasmático rugoso (RER). Cada SREBP contém uma região para ligação ao DNA (bHLH-Zip), e um domínio carboxi-terminal que é responsável pela resposta às variações na concentração de colesterol (BROWN e GOLDSTEIN, 1997). Para chegar ao núcleo e exercer sua

atividade reguladora, o domínio amino-terminal do SREBP é liberado na membrana por um processo proteolítico regido pela proteína ativadora de clivagem de SREBP (SCAP), a qual transporta a forma inativa do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi, onde o complexo SCAP/SREBP será clivado por proteases (S1P e S2P). A redução da concentração celular de esterol estimula a conversão do precursor do SREBP para sua forma ativa ou madura (nSREBP), a qual migra para o núcleo celular onde se liga a elementos responsivos ao esterol (SRE), localizados na região promotora de vários genes, atuando então como fator de transcrição gênica (Figura 1). Ao contrário, quando a concentração de esteróis é elevada, o complexo SCAP/SREBP é retido no retículo endoplasmático por proteínas denominadas gene insulina-induzido (Insig-1 e Insig-2) (YABE et al., 2002).

As proteínas de membrana Insig-1 e Insig-2 estão expressas na maioria dos tecidos, especialmente no fígado e são capazes de bloquear o processamento proteolítico das SREBP no complexo de Golgi, bloqueando a síntese de colesterol, fornecendo um mecanismo para a homeostase lipídica (YABE et al., 2002).

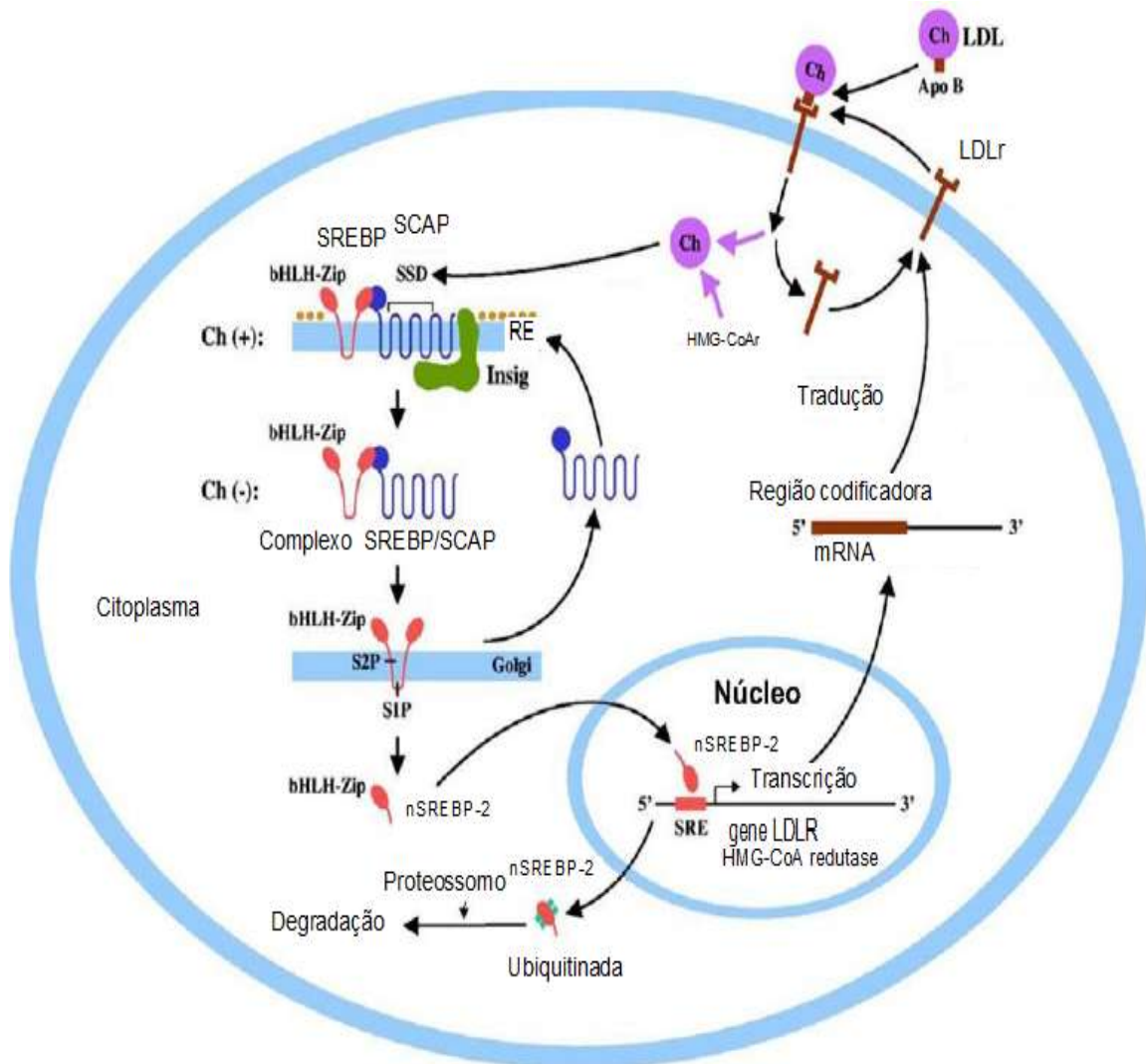


Figura 1. Regulação intracelular da expressão do gene LDLR e da HMG-CoA redutase pelo SREBP-2. bHLH-Zip, zíper de leucina hélice-alça-hélice básico; Ch, colesterol; RE, retículo endoplasmático; HMG-CoA redutase, 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase; Insig, gene insulina induzido; nSREBP-2, SREBP-2 maduro; S1P, protease site-1; S2P, protease site-2; SCAP, proteína de ativação da clivagem do SREBP; SRE, elemento regulador de esteróis (adaptado de ARAZI, 2008).

Pesquisadores relatam aumento da expressão do RNA-mensageiro (*mRNA*) do SREBP em hepatócitos de ratos, após administração de dieta contendo elevado teor de lipídios, fato que comprova a importância deste órgão na homeostase de lipídios, e que mostra que os nutrientes podem regular a expressão de genes hepáticos envolvidos no metabolismo de lipídios em nível transcricional (YAMAMOTO et al., 2004).

Além dos fatores de transcrição, estudos recentes mostram que o metabolismo do colesterol é regulado transcricionalmente por diversas classes de receptores nucleares, dando especial atenção para o receptor X hepático (LXR), que aparece como sensor chave nos níveis intracelulares de esteróis, regulando a expressão de proteínas que controlam a absorção, estoque, transporte e eliminação do colesterol (CHAWLA et al., 2001; ZHANG e MANGELSDORF, 2002).

Segundo Zhang e Mangelsdorf (2002), a expressão de LXR α é regulada pela família de receptores nucleares denominada receptores de proliferadores de peroxissoma (PPAR). Os PPAR são considerados sensores metabólicos, que atuam na expressão gênica, promovendo ações adaptativas relacionadas à homeostase lipídica e energética (FEIGE et al., 2006). Dois subtipos dos PPAR (PPAR α e PPAR γ) estão relacionados ao metabolismo dos lipídios. O PPAR α controla genes envolvidos na produção de lipoproteínas, no catabolismo de ácidos graxos, biotransformação e metabolismo do colesterol, sendo expresso em grande quantidade no fígado, rim, coração e músculos. Além disso, evidências sugerem efeito do PPAR α na redução da expressão de inúmeros fatores pró-inflamatórios no tecido

adiposo, fígado e parede vascular, o que lhe tem conferido efeito anti-aterogênico (ZHANG e MANGELSDORF, 2002; LI e GLASS, 2004).

Estudos sobre a regulação da transcrição do colesterol e do metabolismo dos ácidos graxos têm revelado que estes fatores podem interagir de forma complexa para exercer suas próprias funções de forma mais eficiente (SHIMANO, 2001).

É relatado na literatura que agonistas de PPAR α , como os fibratos (Fenofibrato, Clofibrato), induzem a expressão de LXR α no fígado de ratos, sugerindo uma sobreposição entre as vias de sinalização dos PPAR e LXR. Tal sobreposição pode ser um importante mecanismo protetor contra aterosclerose, visto que os LXR são sensores-chaves no metabolismo dos esteróis (ZHANG e MANGELSDORF, 2002).

Pesquisas realizadas em camundongos evidenciaram que o LXR α tem um papel crucial na homeostase do colesterol e sugerem que pode haver uma relação entre os processos mediados por LXR α e SREBP-2 (PEET et al., 1998; SCHULTZ et al., 2000; ALBERTI et al., 2001). Alberti et al. (2001) verificaram, em camundongos deficientes em LXR α , aumento da expressão do SREBP-2 e de vários genes-alvo dessa proteína, incluindo a HMG-CoA redutase (ALBERTI et al., 2001). Segundo Schultz et al. (2000), agonistas de LXR α podem agir diminuindo a expressão hepática de genes da síntese de colesterol.

Quando a concentração hepática de colesterol está elevada uma via de retroalimentação é ativada e aumenta o catabolismo do colesterol e sua metabolização a ácidos biliares (WONG et al., 2006). Segundo Peet et al.

(1998), o LXR α é o componente-chave desta regulação. Quando há excesso de colesterol o LXR α age como um sensor, associando-se aos oxisteróis (por meio de uma região específica do receptor), e aumenta vários componentes celulares do catabolismo do colesterol. Desta forma, a ausência de LXR α resulta em bloqueio da via do catabolismo que, em parte, determina o rápido acúmulo de colesterol hepático. Em adição, o mecanismo mais pronunciado pelo qual o LXR α mantém o nível de colesterol deve-se a regulação da transcrição de enzimas de síntese de ácidos biliares (WONG et al., 2006).

Segundo Wong et al. (2006), a resposta regulatória à presença de oxisteróis é realizada tanto por SREBP-2 quanto por LXR α . Alguns oxisteróis inibem SREBP-2, enquanto outros servem de ligantes para o LXR α . Os oxisteróis podem ser derivados de lipoproteínas internalizadas ou pela síntese *de novo* colesterol. Deste modo, produtos da via do mevalonato podem servir de ligantes para o LXR α , assim, o SREBP-2 serviria como um regulador indireto dessa proteína nuclear, devido a geração de ligantes para o LXR α .

Outro mecanismo da homeostase do colesterol sugerido deve-se a redução da concentração de SREBP-2 nuclear, via ativação do PPAR α , que contribui para diminuição na expressão de genes-alvo da SREBP-2, como a HMG-CoA redutase e o LDLR, o que implicaria na redução da absorção e da síntese, com redução da concentração de colesterol no fígado, plasma e lipoproteínas de ratos e em células Fao (KÖNIG et al., 2007).

1.5 DIETA E PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA REGULAÇÃO DA SÍNTESE DO COLESTEROL

Com base na premissa de 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, com particular destaque para a HMG-CoA redutase e para o LDLR, 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).

Alguns pesquisadores relataram que os efeitos hipocolesterolêmico e hipotrigliceridêmico da proteína da soja podem ser uma consequência do efeito regulatório do SREBP, envolvido na síntese de triacilgliceróis e colesterol no fígado (TORRES et al., 2006; SHUKLA et al., 2007)

Estudos em ratos, alimentados com isolado protéico de soja, mostraram seu efeito no aumento da expressão do LDLR (fundamental na captação de colesterol) ou na redução da expressão da HMG-CoA redutase; ambos modulados pela fator de transcrição SREBP-2 (TOVAR et al., 2005; SHUKLA et al., 2007). No entanto, o mecanismo de ação desses elementos ainda é controverso e tem sido alvo de muitas investigações.

Estudos com ratos e camundongos sugerem que a proteína da soja pode ser um fator protetor contra o acúmulo de gordura hepática. Os pesquisadores relacionam esse efeito a um incremento na expressão do

PPAR α e de genes que codificam proteínas ligadas ao metabolismo dos ácidos graxos como possíveis responsáveis pela mudança nas concentrações de colesterol e triacilgliceróis hepáticos (IRITANI et al., 1996; TOVAR et al., 2005; BADGER et al., 2008). Estudando o efeito da ingestão da β -conglucilina (7S globulina da soja) em camundongos, Moriyama et al. (2003) verificaram redução na concentração de triacilgliceróis séricos e atribuíram esse efeito a um aumento na β -oxidação de ácidos graxos.

Outros estudos apoiam a idéia de que a proteína da soja age modulando a excreção de colesterol devido à alteração na síntese dos ácidos biliares e na secreção do colesterol para a bile através da expressão de LXR α (TOVAR et al., 2005).

Apesar de os trabalhos citados mostrarem o efeito da proteína vegetal na síntese e na degradação do colesterol, eles não esclarecem o mecanismo de ação da mesma, apenas reforçam a hipótese de que a proteína destes alimentos age no fígado e não na absorção intestinal do colesterol (IRITANI et al., 1996; MORIYAMA et al., 2003; TOVAR et al., 2005; BADGER et al., 2008).

Como exposto anteriormente, a concentração plasmática de colesterol é regulada por um conjunto de processos metabólicos complexos que envolvem a participação de proteínas e enzimas relacionadas com a absorção, síntese, transporte, captação e eliminação do colesterol (HORTON et al., 2002)

Após a comprovação de que a proteína do amaranto é a fração responsável majoritariamente pelo efeito hipocolesterolemizante do referido

pseudocereal (MENDONÇA et al., 2009), faz-se necessário avaliar o efeito da ingestão deste isolado na expressão de proteínas nucleares envolvidas no metabolismo de lípidos 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. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da ingestão do isolado protéico de amaranto, associado ou não a colesterol, no perfil de lipoproteínas plasmáticas e na expressão de proteínas relacionadas à modulação da síntese do colesterol hepático.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito da dieta no peso corporal e no peso do fígado dos animais;
- Avaliar mudanças no perfil lipídico utilizando as concentrações plasmáticas de colesterol total e frações (HDL, não HDL) e as concentrações de triacilgliceróis;
- Avaliar o efeito da ingestão de isolado protéico de amaranto, associado ou não a colesterol, sobre a expressão de proteínas relacionadas com o metabolismo do colesterol (SREBP-2, PPAR α e LXR α) no fígado dos ratos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATÉRIA-PRIMA

Os grãos de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. variedade *BRS-alegria*), obtidos na Celeiro Com. Ind. Ltda (Brasília - DF), foram beneficiados e, posteriormente enviados à empresa Nutribrás (São Paulo-SP) para serem moídos em moinho de martelos até granulometria constante (0,42 mm).

A farinha obtida foi desengordurada com hexano (PA) na proporção 1:5 (m/v), de acordo com metodologia de Martinez e Añón (1996). A mistura foi agitada por 4 horas a 1.730 rpm. Após decantação, a farinha foi filtrada em papel filtro qualitativo e seca em estufa a 45 °C para evaporação total do solvente. A farinha desengordurada foi peneirada em tãmis 0,42 mm (Granutest – Brasil), embalada em sacos de polietileno e mantida sob refrigeração (4 °C) até o momento do uso. Um único lote foi utilizado para todo o experimento.

3.2 OBTENÇÃO DO ISOLADO PROTÉICO

A proteína do amaranto foi isolada pelo princípio de precipitação isoelétrica segundo Martínez e Añón (1996), com modificações de Mendonça (2006). Para cada parte de farinha desengordurada, foram adicionadas dez partes de água. O pH foi elevado para 11,0 com

NaOH 1 mol.L⁻¹ e a mistura foi agitada por 5 horas a temperatura ambiente, permanecendo em repouso por 12 horas a 4 °C . Posteriormente, a mistura foi filtrada e centrifugada a 9000xg por 20 min a 10 °C.

Após novo ajuste do pH do sobrenadante para 5,7 com HCl 1 mol.L⁻¹, o homogenato permaneceu por doze horas a 4 °C para floculação. Uma nova centrifugação a 9000xg foi realizada e o precipitado foi congelado (-20°C).

A fim de eliminar componentes lipídicos com potencial efeito hipocolesterolemizante, o isolado protéico foi desengordurado com etanol 99% na proporção 1:3 m/v, repetindo-se o processo por duas vezes. Após obtenção do isolado protéico desengordurado, o mesmo foi congelado (-20 °C), liofilizado e triturado em moedor de café (Cadence MDR301 – Brasil). Após o processamento, o isolado protéico foi embalado em sacos de polietileno e congelado (-20 °C) até o momento do uso. O Fluxograma de obtenção do isolado protéico da farinha de amaranto desengordurada é apresentado na figura 2.

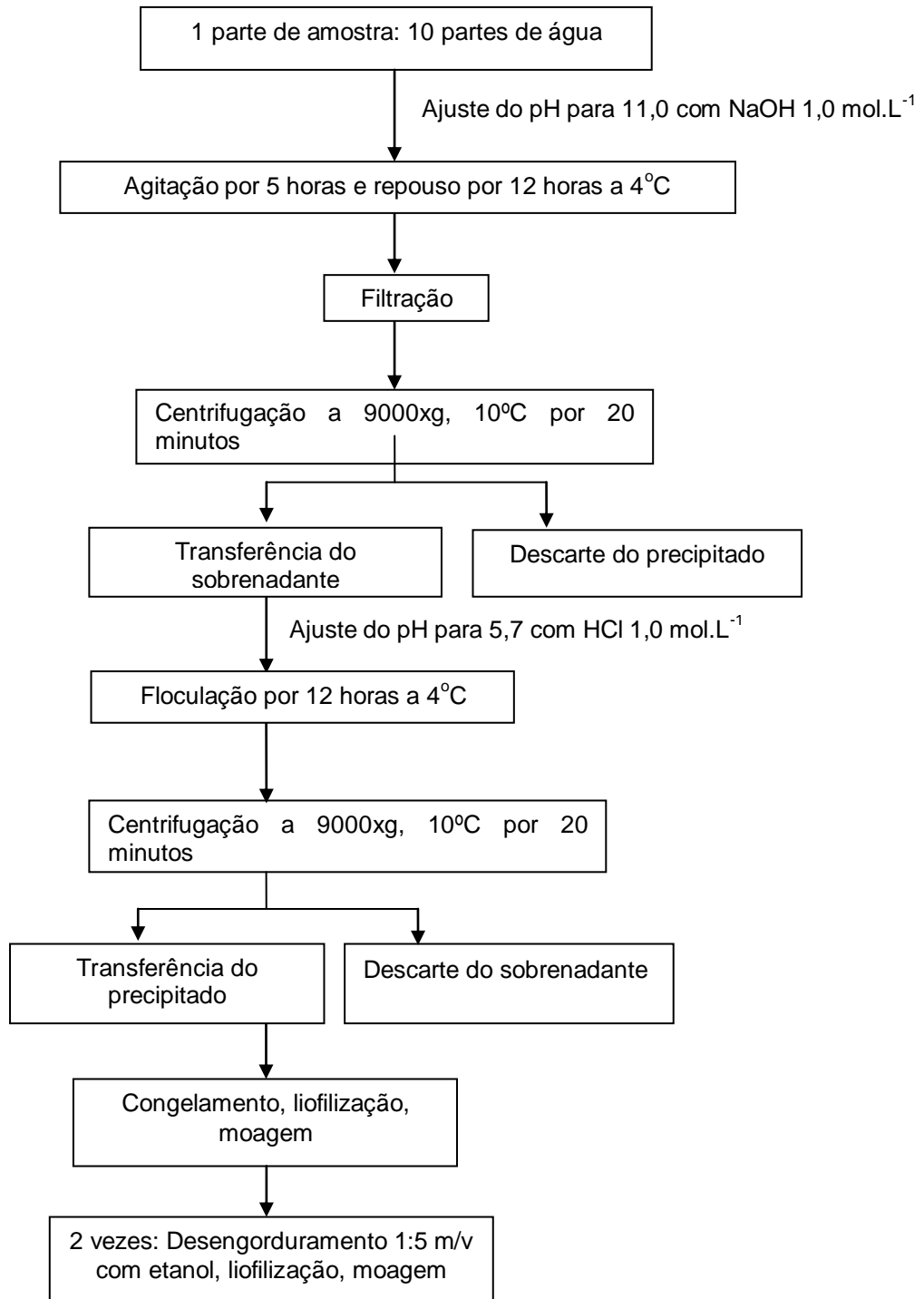


Figura 2 - Fluxograma de obtenção do isolado protéico da farinha de amaranto desengordurada.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

3.3.1 Composição centesimal

As farinhas integral e desengordurada e o isolado protéico de amaranto foram analisados quanto à umidade, por dissecação a 105 °C; cinzas, por incineração da matéria orgânica a 550 °C; e lipídios, por extração a quente com éter de petróleo, de acordo com metodologias descritas pela AOAC (1993). Os carboidratos totais foram calculados por diferença.

Para quantificação do teor protéico, foi utilizado o método de micro-Kjeldhal (AOAC, 1993). Os fatores de conversão de nitrogênio em proteína utilizados foram 5,85 para as farinhas e 6,12 para o isolado protéico, calculados previamente de acordo com o perfil de aminoácidos das farinhas e do isolado protéico (MENDONÇA, 2006). As análises foram realizadas em triplicata.

3.3.2 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 dos 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 (CLAE), de acordo com metodologia proposta por White et al. (1986).

Para a realização da hidrólise menos de 2 gramas de proteína e norleucina (padrão interno) foram utilizados, na razão amostra/padrão interno de aproximadamente 15:1 (p/p). A seguir, foram adicionados 100 mL de ácido clorídrico 6 mol.L⁻¹ contendo 0,1% de fenol e a mistura foi refluxada por 20 h a 110 °C. Após resfriamento, o volume foi completado para 200 mL e a amostra foi filtrada em filtro de fibra de vidro.

Para remoção das proteínas de alto peso molecular e lipídios, a amostra foi eluída em cartucho C18 Sep-pak. Um mililitro de amostra foi adicionado a 2 mL de solução 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético (TFA) em água deionizada e metanol (70:30 v/v), sendo coletados os 2 mL finais da eluição. O ácido clorídrico foi removido de 20 µL da fração coletada por vácuo à temperatura ambiente e a derivatização foi realizada pela adição de 20 µL de solução contendo etanol 95% v/v, água, trietilamina e fenilisotiocianato na proporção em volume 7:1:1:1, resultando nos derivados feniltiocarbamil.

Os derivados foram separados por CLAE em coluna de fase reversa Nova-Pak C18, de 3,9 x 150 mm, sob temperatura de 38 °C. A fase móvel consistiu em dois eluentes. O eluente A era formado por 940 mL de acetato de sódio 0,14 mol.L⁻¹ (pH 6,4) contendo 0,05% de trietilamina e 60 mL de acetonitrila grau HPLC. O eluente B era formado por 60% de acetonitrila grau HPLC e 40% de água deionizada (v/v). O gradiente linear de eluição utilizado foi de 0-100% de B.

O tempo total de análise foi de 25 minutos. Os derivados feniltiocarbamil foram detectados por absorção no UV em 254 nm. As áreas dos picos foram comparadas às da mistura padrão de aminoácidos Pierce (*Amino Acid Standard H*).

Os valores de triptofano foram determinados por espectrofotometria visível em 590 nm. A hidrólise enzimática com pronase a 40 °C por 24 horas foi utilizada, uma vez que a hidrólise ácida destrói este aminoácido (SPIES, 1967)

3.3.3 Eletroforese

A determinação por eletroforese visou comparar os perfis de peso molecular da farinha do grão integral, da farinha desengordurada e do isolado protéico.

A eletroforese SDS-PAGE foi realizada de acordo com metodologia proposta por Laemmli (1970). O gel concentrador contendo 4% (m/v) de acrilamida em tampão TRIS-HCl, pH 6,8, foi preparado sobre o gel de análise com 10% (m/v) de acrilamida em tampão TRIS-HCl, pH 8,8. O equipamento utilizado para eletroforese foi do tipo vertical, da Amersham Biosciences (Uppsala - Suécia) modelo Hoefer miniVE com gel nas dimensões de 8,0 cm x 9,0 cm x 1,0 mm. Cinqüenta microgramas de proteína foram aplicados em cada poço. A amperagem foi 20 mA para cada gel de 1,0 mm. Após a corrida, os géis foram corados com solução de azul de Comassie R Brillhante 0,025% em metanol 40% e ácido acético 7%.

Padrão de peso molecular Kaleidoscope Prestained (BioRad 161-0324) foi utilizado para determinar o peso molecular das frações protéicas. Os géis foram analisados pelo software Ultra-Quant (*Ultralum*, EUA), sendo determinada a densidade ótica das frações protéicas. Os pesos moleculares das frações protéicas foram determinados por comparação com o padrão de peso molecular.

3.4 ENSAIO BIOLÓGICO

3.4.1 Biotério

O biotério de experimentação para ratos do Instituto de Medicina Tropical da USP (IMT-USP) foi utilizado para o experimento. Os animais foram alojados individualmente em caixas com maravalha autoclavada. A temperatura foi controlada entre 20 e 25°C, com janelas escurecidas para controle do ciclo de claro/escuro de 12 horas (luz acesa às 6:00h).

3.4.2 Rações

A formulação das rações foi baseada nas recomendações nutricionais para ratos do National Research Council (1995) e em trabalhos prévios sobre metabolismo do colesterol em ratos (SHUKLA et al., 2007; TACHIBANA et al., 2005) com algumas modificações, de forma a torná-las isoprotéicas e isofosfóricas.

As rações do experimento piloto e principal foram fabricadas sob encomenda, com ingredientes purificados, sendo peletizadas e embaladas à vácuo pela *PragSoluções Biociências* e posteriormente armazenadas em *freezer* (-20 °C) para conservação.

A caseína (*Synth*) foi utilizada como fonte protéica das rações controle. Isolado protéico de amaranto previamente 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 1% de colesterol (*Sigma*) às rações, de forma a produzir um moderado aumento da colesterolemia dos animais (ZHANG et al., 2009).

Foi analisada, em triplicata, a composição centesimal das rações para averiguação dos valores de nutrientes requeridos na formulação. A composição estimada das rações experimentais, bem como seu valor nutritivo, estão descritos no quadro 1.

Quadro 1. Composição estimada e valor nutritivo das rações experimentais

Ingrediente	Caseína (C) (g/kg)	Proteína de amaranto (I) (g/kg)	Caseína + 1% colesterol (Ccol) (g/kg)	Proteína de amaranto + 1% de colesterol (Icol) (g/kg)
Amido de milho	365,8	368,9	355,8	358,9
Amido de milho dextrinizado	100,0	100,0	100,0	100,0
Sacarose	150,0	150,0	150,0	150,0
Caseína ^a	237,2	-	237,2	-
Proteína de amaranto ^b	-	234,1	-	234,1
Óleo de soja	50,0	50,0	50,0	50,0
Colesterol	-	-	10,0	10,0
Celulose	50,0	50,0	50,0	50,0
Minerais ^c	35,0	35,0	35,0	35,0
Vitaminas ^d	10,0	10,0	10,0	10,0
Bitartrato de colina	2,0	2,0	2,0	2,0
Valor Nutritivo(b.s.) ^e				
Matriz seca	924,9	901,8	931,6	912,7
Proteína	221,2	224,6	224,2	219,6
Extrato etéreo	55,2	56,0	63,2	60,3
Carboidratos	719,4	720,8	707,7	714,2
Energia total (kcal/kg ração) ^f	4259,2	4285,6	4296,4	4295,9

^a 93,4 % de proteína

^b 94,6 % de proteína

^c AIN 93G modificado – teores de fósforo da caseína e da proteína de amaranto foram considerados no cálculo de forma a deixar as rações isofosfóricas.

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

^e Determinação realizada seguindo métodos analíticos da AOAC (1993) para proteínas e extrato etéreo, resultados expressos em base seca (b.s.). Carboidratos determinados por diferença.

^f Proteína x 4; Carboidrato x 4 e Lipídios x 9.

3.4.3 Experimento piloto

Foram utilizados 20 ratos machos da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus, variedade albinus, rodentia, mammalia)*, com 21 dias de idade (recém-desmamados). O experimento foi conduzido durante 21 dias. Considerando que ao avaliar o efeito hipocolesterolemizante da proteína de

amaranto, Mendonça (2006) observou redução do consumo de ração pelos animais do grupo experimental alimentados com essa proteína, ainda que não significativa, e que neste trabalho foi utilizado modelo biológico diferente, o ensaio piloto foi realizado de forma a avaliar a ingestão média de ração e ganho de peso dos animais.

Após três dias de adaptação ao local, recebendo ração comercial NUVILAB CRI (Nuvital Nutrientes SA, Colombo – PR) e água *ad libitum*, os animais foram distribuídos em cinco grupos (n=4), por amostragem casual sistemática. Dois grupos receberam ração contendo 20% de caseína, sendo que a ração de um deles continha 1% de colesterol (Ccol) e a outra era isenta (C); outros dois grupos receberam ração contendo 20% de isolado protéico de amaranto, com adição (Icol) ou não (I) de 1% de colesterol; o quinto grupo foi utilizado para estabelecimento de valores basais de lipoproteínas plasmáticas e triacilgliceróis. Assim, após período de jejum de 6 horas, os animais do grupo Basal foram anestesiados, tiveram o sangue coletado por punção cardíaca e foram mortos por exsanguinação. Os procedimentos para coleta de sangue e sacrifício estão descritos no item 3.4.4.1. A composição das dietas está descrita no quadro 1 e o fluxograma do ensaio piloto está representado na figura 3.

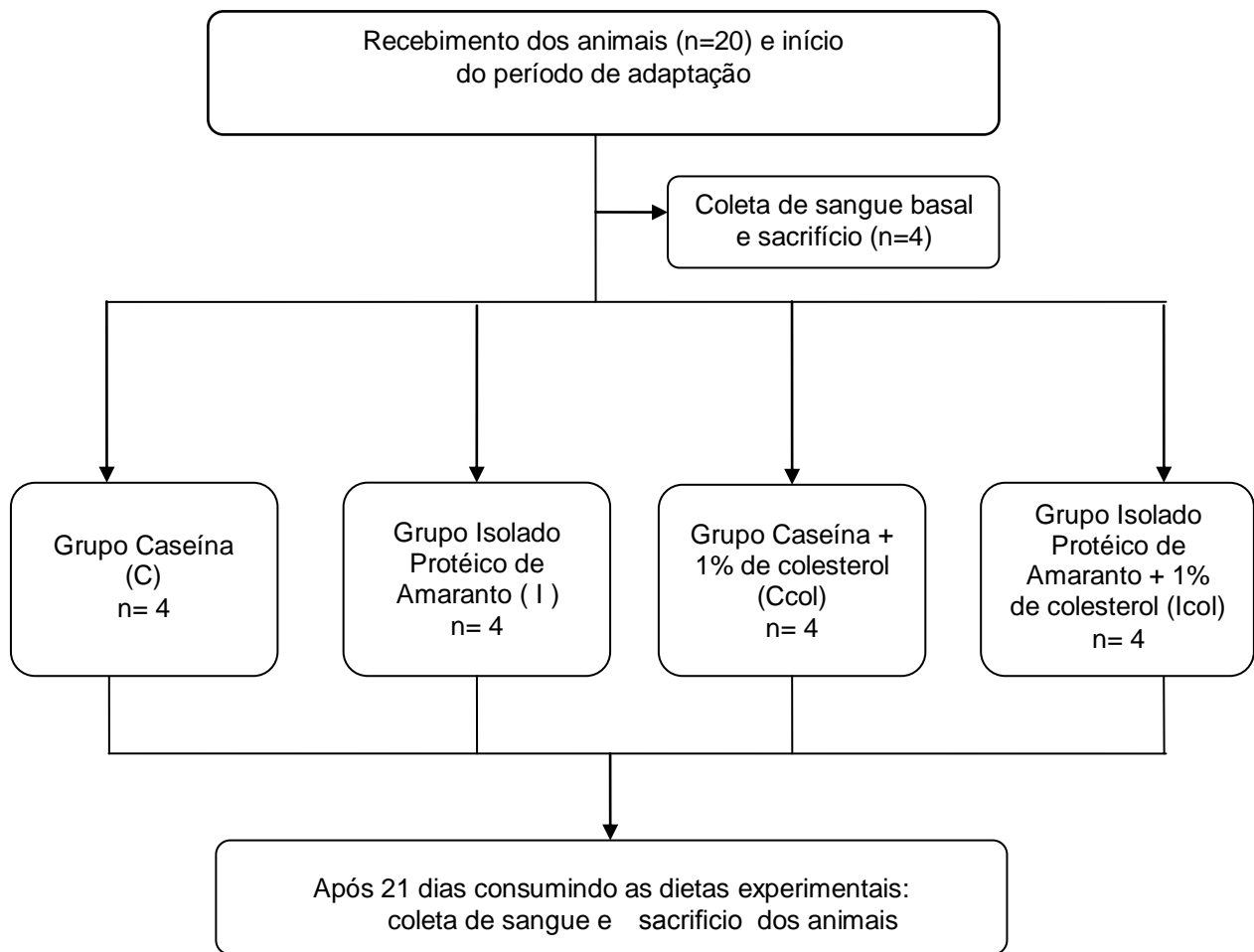


Figura 3. Fluxograma do ensaio piloto.

O consumo das rações foi monitorado diariamente e o peso dos animais, três vezes por semana.

3.4.4 Experimento principal

Foram adquiridos 40 ratos *Wistar* machos, recém-desmamados (aproximadamente 21 dias), no Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP.

Após três dias de adaptação ao local, recebendo ração comercial NUVILAB CRI (Nuvital Nutrientes SA, Colombo – PR) e água *ad libitum*, os animais foram distribuídos em 6 grupos, por amostragem casual sistemática.

O primeiro grupo, composto por 6 animais, foi utilizado para o estabelecimento de valores basais de lipoproteínas plasmáticas e triacilgliceróis. Assim, após jejum médio de 6 horas, os animais do grupo basal (B) foram anestesiados e tiveram o sangue coletado por punção cardíaca. O sangue foi armazenado em tubos heparinizados e os animais foram mortos por exsanguinação, conforme descrito no item 3.4.4.1.

O segundo grupo, denominado Aprotéico (A), com mesmo número de indivíduos do grupo basal, foi utilizado no estudo da digestibilidade verdadeira da proteína, conforme descrito no item 3.4.4.4.

Os 28 animais restantes foram distribuídos em 4 grupos de 7 animais. Cada grupo recebeu, por 21 dias, uma das 4 rações experimentais (C, Ccol, I, Icol). O Fluxograma do ensaio principal se encontra na figura 4.

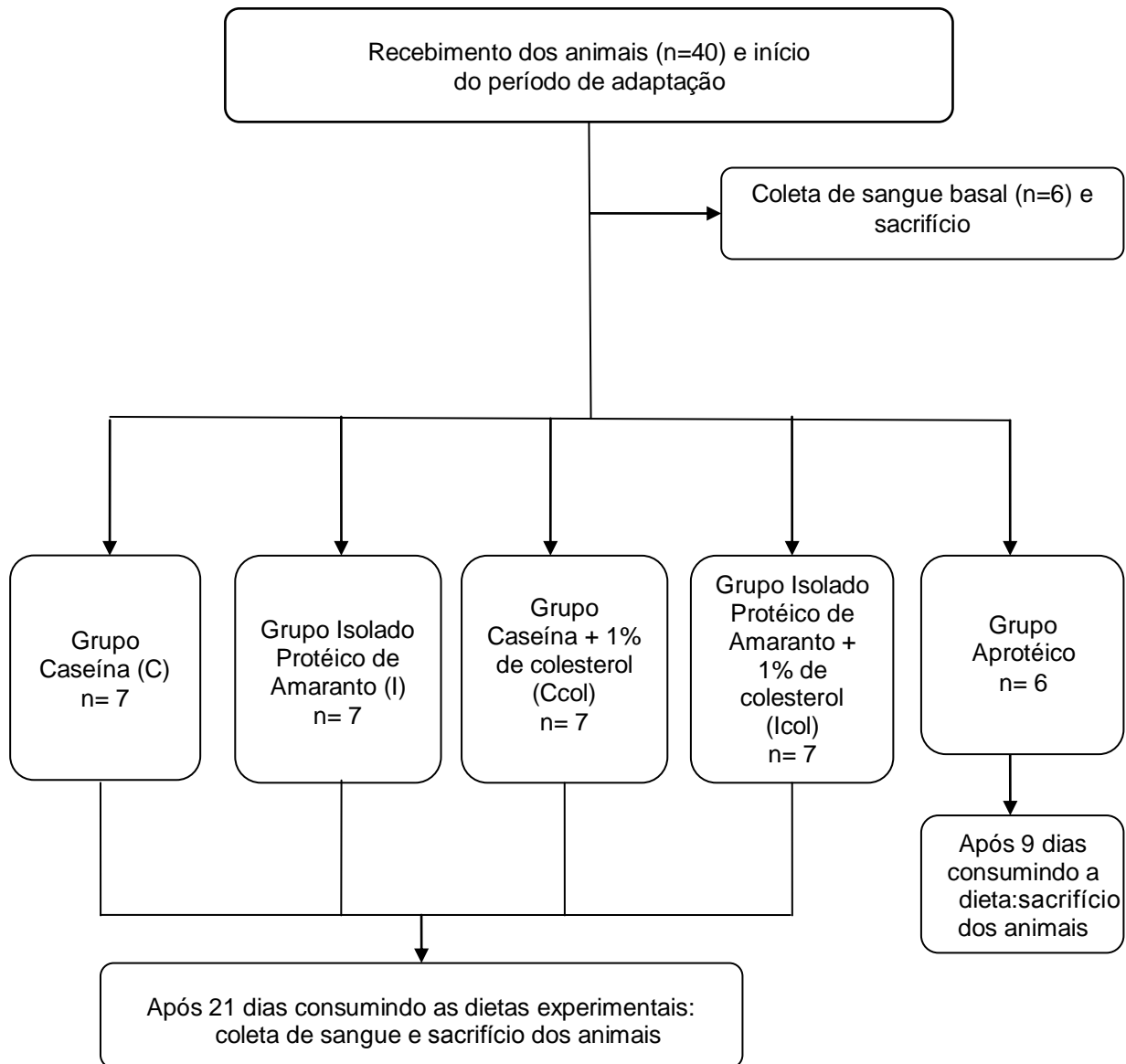


Figura 4. Fluxograma do ensaio principal.

Considerando que no ensaio piloto, com alimentação *ad libitum*, foi verificada diferença significativa no consumo dos animais dos grupos controle e experimental (Quadro 8), foi decidido desenvolver o experimento principal com técnica “*pair feeding*”, ou consumo pareado, de modo a equiparar a ingestão de nutrientes entre os grupos.

3.4.4.1 Procedimentos para coleta de material biológico

As coletas de sangue e o sacrifício dos animais foram realizados após jejum médio de 6 horas. Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com cloridrato de xilasina (Rompun, Bayer ®) e cloridrato de ketamina (Ketalar, Pfizer ®), na razão de 1 mg/kg de peso e 10 mg/kg de peso respectivamente e tiveram o sangue coletado por punção cardíaca o qual foi armazenado em tubos heparinizados. As amostras de sangue foram centrifugadas por 15 minutos, na primeira hora da coleta, a 1.500xg sob temperatura ambiente e o plasma foi separado para análises posteriores.

O fígado foi retirado imediatamente após o sacrifício, pesado e frações de porções iguais do maior lobo foram coletadas, pesadas em balança analítica e armazenadas em microtubos (*Eppendorf*) para posterior análise da expressão protéica. O restante do órgão foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido para análises posteriores. Amostras de tecido adiposo (periepididimal) e muscular (sóleo) foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para análises futuras. Todo material biológico coletado foi armazenado em freezer (-80 °C) para posterior análise. O mesmo procedimento foi adotado para todos os animais.

3.4.4.2 Consumo alimentar

A ingestão dos animais foi avaliada diariamente durante todo o ensaio biológico. A quantidade de ração ingerida foi determinada pela diferença

entre a quantidade de ração ofertada e a sobra no comedouro.

3.4.4.3 Ganho de peso e crescimento

Os animais foram pesados 3 vezes por semana, no mesmo horário, com o auxílio de uma balança digital, durante todo o período experimental para avaliar o ganho de peso e o crescimento.

A partir da razão entre ganho de peso e a quantidade de ração consumida foi calculado o Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) de cada dieta.

3.4.4.4 Digestibilidade da proteína

A avaliação da digestibilidade verdadeira da proteína estudada é fundamental, visto 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)

Para tanto, a digestibilidade protéica verdadeira foi calculada medindo-se a quantidade de nitrogênio ingerido na dieta e excretada nas fezes durante o experimento, e a perda metabólica no material fecal determinado no 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 5) e o grupo denominado Aprotéico (n=6) foi alimentado com ração isenta de proteínas (Quadro 2), para avaliar o teor de

nitrogênio excretado nas fezes, o qual foi considerado como perda metabólica.

Quadro 2. Composição da ração aprotéica (g/kg).

Ingrediente	Ração (g/kg)
Amido de milho	603,0
Amido de milho dextrinizado	100,0
Sacarose	150,0
Óleo de soja	50,0
Celulose	50,0
Minerais ^a	35,0
Vitaminas ^a	10,0
Bitartarato de colina	2,0

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



Figura 5. Gaiola adaptada para coleta de fezes

Após 4 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. Posteriormente, a digestibilidade verdadeira foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

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

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

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

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

3.6 ANÁLISES NO FÍGADO

3.6.1 Determinação de colesterol total

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

Amostra de 700mg de fígado foi homogeneizada em solução de saponificação. Essa solução consistia de hidróxido de potássio na concentração 11g/100mL diluído em etanol 55% (v/v). A amostra foi colocada em banho-maria por 15 minutos a 80 °C. Após resfriamento, foi realizada a partição, sendo selecionada para análise a fase orgânica. A quantificação do colesterol foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em equipamento da marca *Shimadzu SCL-10 (Shimadzu Scientific Instruments-Inc-Japan)*. A fase móvel foi preparada com n-hexano/isopropanol (97:3 v/v), com fluxo isocrático de 1 mL/min. O detector utilizado foi o UV, com leitura no comprimento de onda de 206 nm. A quantificação foi realizada utilizando curva de calibração de colesterol padrão da *Steraloids Inc-USA*. As análises foram realizadas em triplicata.

Para avaliar a eficiência do método empregado, foi realizado o teste de recuperação de colesterol, utilizando-se como analito o colesterol da empresa *Staraloids* (98% de pureza). Segundo Leite (1998), a determinação do fator de recuperação do método é importante para garantir que a substância de interesse seja quantificada na sua totalidade. O fator de

recuperação ($Fator_{rec}$) foi calculado pelo produto entre a área do pico do padrão puro injetado diretamente no HPLC e a área do pico do padrão processado pelo método de forma equivalente às amostras, segundo a fórmula:

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

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

3.6.2 Determinação de lipídios totais

Para obtenção do extrato lipídico, foi utilizado o método de Bligh e Dyer (1959). A quantidade de lipídios totais extraídos foi determinada gravimetricamente.

3.6.3 Extração das proteínas nucleares

As proteínas do fígado dos ratos foram extraídas em duplicata, utilizando kit específico (NEPER, *Pierce*) e seguindo as orientações do fabricante. Alíquotas deste extrato foram separadas em microtubos (*Eppendorf*) para determinação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976) e quantificadas em leitor de placas *Spectra Max M5 (Molecular Devices)*. A concentração das proteínas foi determinada em triplicata,

utilizando o *software Soft Max Pro*.

3.6.4 *Western-blotting*

As proteínas do extrato hepático foram separadas por eletroforese SDS-PAGE, utilizando equipamento tipo *miniVE Vertical Electrophoresis System (GE Healthcare Life Science)* e seguindo o método descrito por Laemmli (1970).

O gel concentrador contendo 4% m/v de acrilamida em tampão TRIS-HCl, pH 6,8, foi preparado sobre o gel de análise com 10% m/v de acrilamida em tampão TRIS-HCl, pH 8,8. Quinze microgramas de proteína foram aplicados em cada poço. A amperagem fixa foi 20 mA para cada gel de 1,0 mm.

Após a separação das proteínas por eletroforese, foi realizada análise de *Western-blotting* em membrana de nitrocelulose (*Hybond-ECL, Amersham Biosciences*). Os anticorpos primários SREBP-2 (68kDa), PPAR α (52kDa), LXR α (64kDa) e PCNA (29kDa) foram usados (*ABCAM, Inc*). A membrana foi então incubada em tampão de bloqueio contendo albumina (7%) para evitar ligações inespecíficas dos anticorpos. Após o bloqueio, procedeu-se a incubação da membrana com o anticorpo primário para as proteínas SREBP-2 (1:200), PPAR α (1:500) e LXR α (1:350). Para visualizar o complexo proteína-anticorpo, foi utilizado um anticorpo secundário (1:3000) contra o anticorpo primário, sendo este complexado com enzima horseradish peroxidase (HRP) (*Amersham Biosciences*). Substrato quimioluminescente

foi adicionado para permitir a visualização das proteínas estudadas (ECL, *Amersham Biosciences*). Como controle positivo (*Housekeeping*) foi utilizado PCNA (1:200) específico para proteínas nucleares. As imagens foram capturadas com o auxílio do software *ImageQuant LAS (GE Healthcare)* e a densidade das proteínas foi determinada. Todos os resultados foram normalizados utilizando a proteína nuclear PCNA, membrana por membrana.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos por média e desvio padrão (análises em matéria-prima) ou erro padrão (análises em material biológico). Foi realizada análise de variância (ANOVA) e as comparações múltiplas do teste de *Tukey* nas variáveis com distribuição normal. Para verificar diferença na expressão das proteínas foi utilizado test “t” de *Student* para variáveis independentes. O programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) foi utilizado, sendo as médias consideradas diferentes ao nível de 5% de significância.

3.8 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 o número 026/2008 (ANEXO 1).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

4.1.1 Composição centesimal

O quadro 3 apresenta os resultados obtidos na análise de composição das farinhas de amaranto integral e desengordura, do isolado protéico liofilizado e desengordurado e da caseína utilizada na produção das rações.

Quadro 3. Composição centesimal das amostras analisadas (base seca).

Amostra	Cinzas (g/100g)	Proteínas (g/100g)	Lipídeos (g/100g)	Carboidratos* (g/100g)
Farinha Integral	2,85 ±0,17	15,30 ±0,33	7,45 ±0,03	74,40
Farinha desengordurada	2,84 ±0,11	15,90 ±0,69	1,68 ±0,80	79,60
Isolado protéico de Amaranto	1,33 ±0,00	94,60 ±0,41	0,29 ±0,04	3,77
Caseína	1,91 ±0,08	93,40 ±0,60	0,15 ±0,04	4,51

Resultados expressos por média ± desvio padrão.

*Carboidratos determinados por diferença.

O teor de proteína encontrado para as amostras de farinha de amaranto está de acordo com o relatado pela literatura para essa espécie

(em torno de 15g/100g) se considerado o fator de conversão de nitrogênio para proteína de 5,85 (MENDONÇA et al., 2009). Como verificado no quadro 3, as etapas de desengorduramento da farinha de amaranto, bem como do isolado protéico foram bastante eficientes, visto que foi possível remover quase que totalmente a fração lipídica do isolado.

O isolamento da proteína possibilitou obter uma farinha com alto teor protéico (94,60%). Alguns autores consideram o isolado protéico obtido da farinha de amaranto um produto com cerca de 80 a 85% de proteínas (SALCEDO-CHÁVEZ et al., 2002; SCILINGO et al., 2002). Segundo a Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA), a proteína de soja é tida como isolado protéico quando o seu grau de pureza é superior a 88% (ABIA, 1992). Conclui-se que o método de isolamento da proteína foi eficaz e permitiu obter uma proteína isolada, com alto grau de pureza.

4.1.2 Teor de aminoácidos do isolado protéico de amaranto e da caseína

Os resultados obtidos na análise do teor de aminoácidos do isolado protéico de amaranto do presente projeto foram comparados aos obtidos por Mendonça et al. (2009) (Quadro 4), no qual foi observado o efeito da proteína de amaranto na redução do colesterol, e estão próximos dos encontrados no referido trabalho.

Quadro 4. Teor de aminoácidos da caseína, do isolado protéico de amaranto seco e desengordurado (g/100g de proteína).

Aminoácidos	Isolado protéico de amaranto ^a	Isolado protéico de amaranto ^b	Caseína
Arginina	11,90	10,40	3,95
Histidina	3,29	2,90	2,86
Isoleucina	3,88	4,60	4,68
Leucina	6,66	7,10	9,83
Lisina	5,26	5,30	7,99
Treonina	3,98	3,80	4,51
Triptofano	1,43	1,80	1,36
Valina	3,94	5,10	5,44
Ácido aspártico	8,74	8,50	7,76
Ácido glutâmico	18,10	17,70	23,30
Serina	5,78	4,90	6,28
Glicina	6,49	6,10	2,33
Alanina	4,17	4,10	3,50
Prolina	5,53	5,30	12,20
Tirosina	4,22	3,90	5,63
Fenilalanina	4,99	5,10	5,05
Metionina	3,41	2,40	4,12
Cistina	2,22	1,80	1,76

^a: isolado protéico obtido no presente estudo

^b: isolado protéico obtido por Mendonça et al. (2009)

A relação lisina/arginina encontrada no isolado protéico produzido no presente projeto foi de 0,44 e está próxima do valor encontrado por Mendonça et al. (2009) que foi de 0,51. Sugere-se que este quociente seja um indicativo do efeito hipocolesterolemizante da proteína, dado que quanto menor este valor, menor será a colesterolemia (SANCHEZ et al., 1988). No entanto, na atualidade, a hipótese sugerida como a mais provável para explicar a redução do colesterol plasmático é atribuída a presença de

peptídeos bioativos (SIRTORI et al., 1995; LOVATI et al., 1996; LOVATI et al., 2000; AOYAMA et al., 2000; SOARES, 2008).

Como informação adicional, os valores obtidos na determinação da composição dos aminoácidos essenciais da proteína isolada de amaranto foram comparados aos valores recomendado pela FAO/WHO (1991), de modo a avaliar a qualidade da proteína testada. Para tanto, foi calculado o escore químico de aminoácido (Quadro 5), determinado pela razão entre a quantidade de cada aminoácido presente na proteína testada e seu valor recomendado para pré-escolares (2-5 anos de idade) (FAO/WHO, 1991). Essa é uma técnica considerada rápida, que permite determinar a presença de aminoácidos limitantes na proteína em questão. Esse padrão é usado porque considera as necessidades de aminoácidos do ser humano, ultrapassando os valores das necessidades de crianças maiores e de adultos (FAO/WHO, 1991).

Quadro 5 - Recomendação de aminoácidos essenciais da FAO/WHO e escore químico de aminoácidos do isolado protéico.

Aminoácidos	Recomendação FAO/WHO¹ (1991)	Escore do isolado protéico
Treonina	3,4	1,2
Metionina+ cistina	2,5	2,3
Valina	3,5	1,1
Isoleucina	2,8	1,4
Leucina	6,6	1,0
Fenilalanina + Tiosina	6,3	1,5
Lisina	5,8	0,9*
Histidina	1,9	1,7
Triptofano	1,1	1,3

*representa aminoácido limitante

¹ Requerimento mínimo de aminoácidos essenciais estabelecidos para crianças de 2 a 5 anos de idade

Valores maiores que 1,0 indicam que a proteína é de boa qualidade, contendo os aminoácidos essenciais capazes de suprir as necessidades para a dieta de humanos. Desta forma, o escore químico dos aminoácidos da proteína de amaranto permite verificar que a lisina é o aminoácido limitante, resultado que está de acordo com os estudos de Gorinstein et al. (2002), Drzewiecki et al. (2003) e Soares (2008). Por outro lado, alguns autores apontam apenas a leucina como aminoácido limitante (BECKER et al., 1981; DUARTE-CORREA et al., 1986; MENDONÇA, 2006). Possivelmente essa divergência está associada às espécies analisadas, a diferenças no solo e clima durante o cultivo do grão, ou ainda à metodologia utilizada.

4.1.3 Perfil molecular das proteínas do isolado protéico de amaranto

O perfil molecular das proteínas das farinhas integral e desengordurada e do isolado protéico obtido permitem verificar que as etapas de processamento da matéria-prima e isolamento da proteína de amaranto não modificaram o perfil de proteínas do amaranto, como pode ser verificado na figura 6.

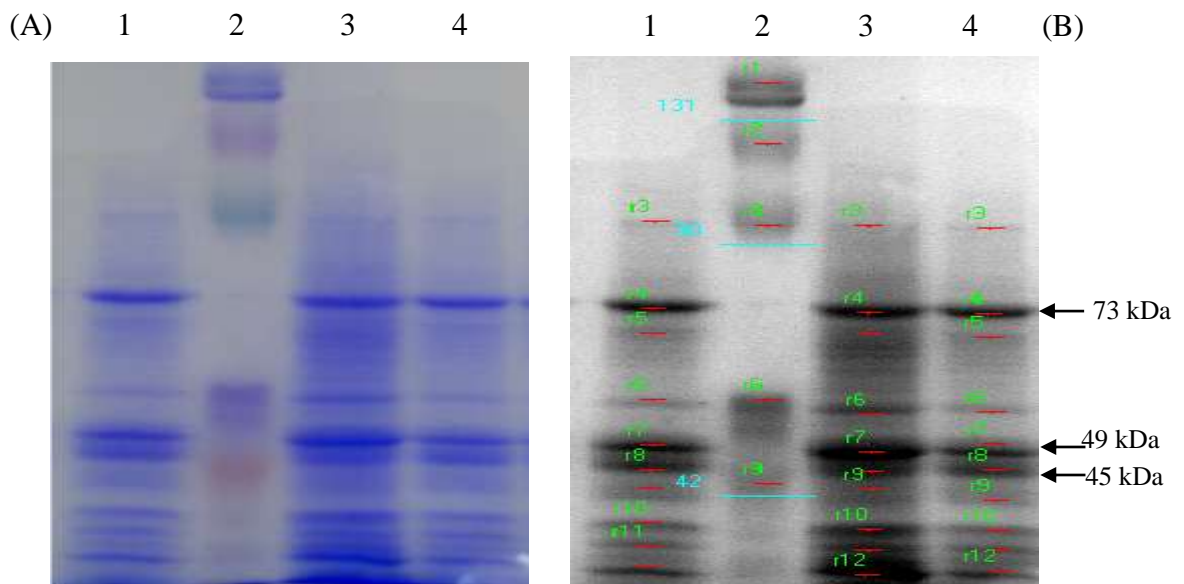


Figura 6. Gel de Eletroforese SDS-PAGE 10% (A) e perfil densiométrico (B).1: Farinha de amaranto desengordurada; 2: Padrão de peso molecular; 3: Isolado protéico de amaranto; 4: Farinha de amaranto integral. As setas indicam o peso molecular das frações com maior densidade ótica (DO)

Ressalta-se que não foi possível observar frações de baixo peso molecular (Quadro 6), com peso entre 7 e 30kDa, devido a uma distorção do gel na porção inferior. Segundo Gorinstein et al. (1998) algumas frações de glutelinas do amaranto estariam contidas nestas frações de menor peso

molecular.

Quadro 6. Peso molecular (kDa) e densidade ótica (DO) da farinha de amaranto integral, do isolado protéico e da farinha desengordurada.

Fração protéica	Farinha integral		Isolado protéico		Farinha desengordurada	
	kDa	DO	kDa	DO	kDa	DO
1 (r3)	96,4	2,21	95,1	2,01	94,4	2,59
2 (r4)	74,0	15,77	73,1	14,46	72,8	15,94
3 (r5)	68,6	5,93	68,6	6,49	67,8	6,37
4 (r6)	56,2	6,35	53,6	8,47	54,1	6,05
5 (r7)	48,9	18,38	47,9	20,34	49,1	19,75
6 (r8)	45,4	14,29	45,2	14,03	45,4	14,59
7 (r9)	42,9	7,85	42,8	6,03	41,4	6,70
8 (r10)	38,7	10,10	37,9	11,06	37,7	10,11
9 (r11)	36,0	8,02	35,6	7,30	35,6	7,70
10 (r12)	33,8	11,11	33,0	12,82	33,4	10,19

Proteínas com peso molecular superior a 60kDa são formadas majoritariamente por albuminas e glutelinas do amaranto. Verificam-se proteínas de diversos pesos moleculares, com destaque para aquelas com peso molecular próximo de 45, 49 e 73 kDa como mostrado na figura 6. Segundo Soares (2008), essas frações representam glutelinas e globulinas 11S.

As frações albumina, globulina 11S, globulina-P e glutelina das proteínas do grão do amaranto podem conferir aos isolados protéicos uma boa variedade de propriedades estruturais e físico-químicas. Além disso, tais proteínas, em outros produtos de origem vegetal, são as responsáveis por codificar os fragmentos peptídicos que estão envolvidos na redução do

colesterol plasmático (CASTELLANI et al., 2000; MARCONE et al., 1994; MARTÍNEZ et al., 1997; SEGURA-NIETO et al., 1994).

4.1.4 Digestibilidade protéica

Uma menor digestibilidade da proteína pode explicar a redução do colesterol plasmático nos ratos. Dados da literatura mostram 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, concomitantemente a absorção intestinal do colesterol seria reduzida, tendo, portanto um efeito semelhante ao de fibras (TERPSTRA et al., 1994). Esse mecanismo de aumento na excreção de colesterol é tido como um dos responsáveis pelo efeito hipocolesterolemizante das proteínas vegetais (DUANE, 1997).

Os resultados obtidos para a digestibilidade da proteína indicaram que, apesar de próximas, as digestibilidades da proteína de amaranto e caseína diferem estatisticamente entre os animais dos grupos C e I. É possível que esta diferença não seja fisiologicamente representativa (Quadro 7), visto que não houve diferença entre os outros grupos (Ccol e Icol).

Quadro 7. Digestibilidade da caseína e da proteína de amaranto com e sem a adição de 1% de colesterol.

Grupo	Digestibilidade protéica (%)
C	96,0 (0,37) ^a
I	93,3 (0,45) ^b
Ccol	95,3 (0,37) ^{ac}
Icol	94,4 (0,33) ^{bc}

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

Alguns autores reportam digestibilidade de 93% para a caseína (IMERI et al., 1987). Já de acordo com Mc Donough et al. (1990), a digestibilidade da caseína é de cerca de 98,6% em ratos. Estes resultados estão próximos aos encontrados no presente estudo.

Pesquisas realizadas com amaranto relataram digestibilidade protéica que varia entre 76 a 85%, dependendo da variedade estudada (IMERI et al., 1987). Outros autores destacam digestibilidade ao redor de 82 - 89% para amostra crua e desengordurada (GARCIA et al., 1987), extrusado e pipoca (BRESSANI et al., 1993). No presente estudo, diversos compostos que poderiam agir reduzindo a digestibilidade da proteína foram eliminados nas etapas de isolamento, promovendo uma maior digestibilidade, visto tratar-se de uma proteína isolada.

Ao estudar a digestibilidade da proteína de amaranto, Mendonça et al. (2009) verificaram digestibilidade de 98,8% em hamster, descartando a

possibilidade de ação da proteína isolada como fibra. Entretanto, os resultados obtidos no presente trabalho são inferiores, possivelmente devido ao uso de modelos animais diferentes.

4.2 ENSAIO BIOLÓGICO

O uso de modelos animais em estudos que avaliam os efeitos de drogas e dietas sobre as concentrações de lipídios apresenta limitações, como a falta de similaridade no perfil de lipoproteínas plasmáticas ou na atividade das enzimas regulatórias do metabolismo das lipoproteínas e do colesterol hepático, fato que dificulta a comparação dos resultados obtidos em modelos animais com os resultados de estudos realizados com seres humanos (BADIMON et al., 1990; FAN et al., 1999; BROSSEAU e HOEG, 1999; ZHANG et al., 2009).

Um modelo com grande similaridade aos humanos são os porcos. Contudo, seu grande porte dificulta a investigação sobre o efeito da dieta na hiperlipidemia, uma vez que demanda maiores cuidados e grandes quantidades do agente experimental para a obtenção de algum efeito (RUSSELL e PROCTOR, 2006).

O coelho é outro modelo também bastante utilizado. Apesar de rápido desenvolvimento da lesão aterosclerótica (DALEY et al., 1994), não apresentam lipase hepática e apoproteína AII (Apo-AII), as quais desempenham importante papel na homeostase do colesterol. Outro inconveniente de usar esta espécie reside no fato de que estes animais

transportam a maior parte do colesterol na fração VLDL, diferentemente dos humanos, nos quais o transporte é feito predominantemente pela LDL ou VLDL (BADIMON et al., 1990; FAN et al., 1999; BROSSEAU e HOEG, 1999)

Ratos e hamsters são menores e comumente usados em estudos que avaliam o efeito de alimentos funcionais, contudo estes animais respondem de forma diferente à dieta. A hipercolesterolemia em ratos pode ser atingida com a adição de 1% de colesterol à dieta, ao passo que para os hamsters a adição de 0,1% é suficiente (ZHANG et al., 2009). Assim como os humanos, hamsters são hiper-responsivos ao colesterol da dieta, ao passo que nos ratos esta resposta é mais discreta. Além disso, o principal carreador de colesterol plasmático em ratos é a HDL, ao passo que o hamster carrega 50% do colesterol nas LDL, sendo por esse motivo mais próximo aos humanos.

Tem sido sugerido que a hipercolesterolemia é mais facilmente induzida em hamsters do que em ratos, entretanto, alguns trabalhos têm conseguido elevar as concentrações de colesterol em ratos alimentados com dietas ricas neste lipídio, o que sugere que este animal também pode ser usado (LIN et al., 2005). Além disso, ratos são animais maiores que os hamsters, permitindo a coleta de maior quantidade de material biológico. Estudos recentes que avaliaram o efeito de dieta no metabolismo dos lípidos e na homeostase do colesterol obtiveram bons resultados nestes animais (IRITANI et al., 1996; YAMAMOTO et al., 2004; TOVAR et al., 2005; TACHIBANA et al., 2005; SHUKLA et al., 2007).

4.2.1 Experimento piloto

Os animais aceitaram bem as dietas e apresentaram-se saudáveis durante todo o experimento. Contudo, diferenças no comportamento alimentar foram observadas durante o experimento, verificando-se maior consumo de dieta pelos animais dos grupos C e Ccol em relação aos grupos I e Icol (Quadro 8), determinando diferença significativa no ganho de peso e conseqüentemente no crescimento destes animais.

Quadro 8. Ganho de peso dos animais e consumo total das rações após 21 dias de administração das rações *ad libitum*.

Grupo	Ganho de peso total (g)	Consumo total (g)	Consumo/dia (g)
C	161,2 (4,17) ^a	375,0 (3,44) ^a	17,0 (0,31) ^a
I	94,6 (4,83) ^b	251,0 (6,25) ^b	11,4 (0,57) ^b
Ccol	156,0 (1,2) ^a	381,0 (8,45) ^a	17,3 (0,77) ^a
Icol	93,7 (2,6) ^b	234,0 (7,37) ^b	10,6 (0,67) ^b

Os resultados estão expressos como média e erro padrão (n=4); Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si. ANOVA, Tukey ($p \geq 0,05$); C= caseína; I = isolado protéico de amaranto; Ccol= caseína + 1% de colesterol; Icol= isolado protéico de amaranto + 1% de colesterol.

Uma hipótese para justificar o efeito da menor ingestão das rações seria fundamentada na produção de peptídeos após a digestão de proteínas, responsáveis por iniciar sinais de saciedade do intestino (PUPOVOC e

ANDERSON, 2002). Estudando a presença de peptídeos bioativos na proteína do amaranto *hipocondriacus*, Silva-Sanchés et al. (2008), descobriram cerca de 500 peptídeos bioativos na fração glutelina desta variedade e identificaram um peptídeo com potencial efeito anorexígeno. A presença deste peptídeo justificaria, em parte, o menor consumo de ração pelo animais dos grupos que receberam proteína de amaranto. Entretanto, Soares (2008), ao avaliar a presença destes compostos na variedade BRS-*Alegria*, a mesma utilizada no presente estudo, não identificou peptídeos com tal função biológica nas condições adotadas no referido estudo, sugerindo a realização de mais estudos a este respeito.

Uma alternativa para contornar a diferença de ingestão foi o desenvolvimento do experimento principal com controle do tipo “*pair feeding*”, de forma a igualar o consumo dos animais, minimizando assim conclusões equivocadas, possivelmente geradas pela diferença no consumo de ração (CASTER e ARMSTRONG, 1955).

Sempre que há redução de consumo e de peso, é fundamental descobrir até que ponto a redução na ingestão dos animais é a responsável pelos resultados obtidos, especialmente em estudos que pretendem verificar o efeito de uma determinada substância no metabolismo dos animais (CASTER e ARMSTRONG, 1955). Sendo assim, o controle “*pair feeding*” é uma forma de contornar esta diferença e equiparar o consumo dos animais, pois com a adoção deste método, o grupo controle recebe a mesma quantidade de alimento que o grupo experimental (CASTER e ARMSTRONG, 1955).

Desta forma, no experimento principal, ao grupo C foi oferecida a média de consumo diário dos animais do grupo I (11,4g) e, ao grupo Ccol, foi oferecida a média da ingestão diária do grupo Icol (10,6g).

4.2.2 Experimento principal

4.2.2.1 Monitoramento do ganho de peso e consumo de ração

No Quadro 9, observa-se a média do ganho de peso, do consumo de ração, bem como do CEA (%) dos animais dos grupos C, I, Ccol e Icol.

O consumo total e diário de ração foi equivalente entre os animais dos Grupos C e I, Icol e Ccol em função do controle “pair feeding” já citado. Animais alimentados com as dietas Icol e I ganharam menos peso que os alimentados com as dietas C e Ccol. No entanto, não houve prejuízo nutricional, uma vez que esta diferença de ganho de peso não foi estatisticamente significativa. Contudo, estes resultados refletiram no CEA dos animais que consumiram proteína de amaranto (grupos I e Icol), tendo sido menores nestes grupos em comparação aos que consumiram caseína (grupos C e Ccol).

Quadro 9. Ganho de peso, consumo e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) dos grupos I, Icol, C e Ccol.

Grupos	C	I	Ccol	Icol
Peso inicial (g)	72,3 (2,65) ^a	71,5 (2,37) ^a	74,5 (2,89) ^a	73,3 (2,33) ^a
Peso final (g)	181,0 (2,30) ^a	157,0 (5,33) ^a	168,0 (2,08) ^a	156,0 (12,40) ^a
Consumo total (g)	250,0 (1,35) ^a	256,0 (9,17) ^a	231,0 (1,48) ^a	240,0 (5,94) ^a
Consumo/dia (g)	11,4 (0,06) ^a	11,7 (0,42) ^a	10,6 (0,05) ^a	10,9 (0,27) ^a
Ganho peso (g)	108,7(1,23) ^a	93,8 (1,77) ^a	90,1 (7,49) ^a	87,0 (11,50) ^a
CEA (%)	43 (0,01)	35 (0,03)	41 (0,01)	36 (0,06)

Os dados estão expressos como média (erro padrão). Letras iguais na mesma linha indicam que as médias não diferem entre si, ANOVA, Tukey ($p>0,05$). C= caseína; I = isolado protéico de amaranto; Ccol = caseína + 1% de colesterol; Icol= isolado protéico de amaranto + 1% de colesterol

Resultados semelhantes ao deste estudo foram observados por outros autores (SCHNEEMAN, 1984; MENDONÇA et al., 2009), que verificaram uma diferença, também não significativa, na média do ganho de peso de animais alimentados com isolado protéico de origem vegetal e menor coeficiente de eficiência alimentar, em comparação ao grupo alimentado com ração contendo caseína.

Embora tenha sido observado menor CEA para os animais dos grupos I e Icol é possível que este resultado não tenha sido um fator responsável por qualquer efeito no colesterol sanguíneo destes animais, visto que não houve diferença significativa no ganho de peso. Além do mais, segundo alguns autores, parece não haver relação entre a resposta de

crescimento devido à dieta e sua habilidade em influenciar as concentrações de colesterol (YADAV e LIENER, 1977).

4.2.2.2 Perfil de lipídios plasmáticos

A necessidade de jejum prévio à coleta de sangue e sacrifício em ensaios biológicos ainda é controversa. Alguns autores recomendam jejum de 12 horas, outros não submetem os animais ao jejum e há ainda aqueles que recomendam jejum por curto período (WANER E NISKA, 1994). De forma geral, a modificação do metabolismo em resposta a longo período de jejum levaria a uma significativa redução na expressão dos genes envolvidos no metabolismo do colesterol, o que poderia comprometer os resultados deste trabalho (WANER e NYSKA, 1994; HORTON et al., 1998; STANGL et al., 2007). Segundo Waner e Niska (1994), o jejum por período inferior a 8 horas não afeta as concentrações plasmáticas de lipoproteínas e de triacilgliceróis em ratos. Desta forma, optou-se por realizar as coletas de sangue e o sacrifício dos animais após jejum médio de 6 horas.

Estudos sobre o impacto da fonte protéica nas concentrações plasmáticas de colesterol têm conclusões divergentes quanto à necessidade da presença de colesterol na dieta. No presente trabalho, colesterol foi adicionado às dietas, pois a maioria das espécies é sensível a diferentes proteínas dietéticas e estes efeitos aumentam quando os animais são expostos a dietas hipercolesterolêmicas (SIRTORI et al., 1993).

Com relação ao nível basal de colesterol, foi verificado que a adição

de 1% de colesterol na dieta promoveu um aumento de 5% no colesterol plasmático nos animais do grupo Icol e 40% nos animais do grupo Ccol. Segundo Sirtori et al. (1993), a adição de colesterol à dieta, resulta em hipercolesterolemia moderada em diversas espécies, inclusive no rato.

No presente estudo, a presença de colesterol na dieta Icol acentuou o efeito hipocolesterolemizante da proteína de amaranto (Quadro 10) em relação ao grupo Ccol. O grupo Icol teve menor teor de colesterol (36%) e triacilgliceróis (47%) no plasma, quando comparado ao grupo Ccol, conforme pode ser observado no quadro 10. Os animais alimentados com dieta I apresentaram concentrações plasmáticas de colesterol inferiores (23%) ao do grupo C, mas esta diferença não foi significativa.

Este resultado corrobora os de Van der Meer e Beynen (1987) que verificaram que a diferença entre as concentrações plasmáticas de colesterol de animais de diferentes espécies alimentados com caseína ou proteína de origem vegetal aumenta na presença de colesterol dietético.

Quadro 10. Concentração plasmática de colesterol total (CT), frações do colesterol e triacilgliceróis (TG) dos animais (mg/dl).

Grupo	CT (mg/dL)	HDL-c¹ (mg/dL)	não HDL-c² (mg/dL)	TG (mg/dL)
B	76,9 (7,54)	24,4 (3,35)	52,5 (9,95)	81,2 (27,80)
C	96,6 (13,70) ^{ab}	39,0 (5,60) ^{ab}	57,5 (8,20) ^{ab}	94,4 (23,80) ^{ab}
I	74,2 (5,50) ^a	30,2 (2,20) ^a	44,0 (5,30) ^a	70,9 (5,40) ^a
Ccol	127,9 (9,90) ^b	51,9 (4,00) ^b	76,0 (6,00) ^b	149,4 (22,80) ^b
Icol	81,8 (8,20) ^a	34,7 (3,20) ^a	47,1 (6,70) ^a	89,0 (4,70) ^a

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

Resultado semelhante foi reportado por Sirtori et al. (1984) ao comparar o efeito hipocolesterolemizante da proteína de soja em relação à caseína. Observou que ratos alimentados com proteína da soja tiveram redução no colesterol total e triacilgliceróis em comparação aos animais alimentados com caseína.

Em estudo com ratos alimentados com proteína de soja isenta de isoflavonas, Shukla et al. (2007) verificaram redução nas concentrações de triacilgliceróis plasmáticos sem qualquer modificação na concentração de colesterol total.

Fukui et al. (2004) verificaram, em ratos tratados com isolado protéico

de soja livre de isoflavonas, uma redução significativa da concentração do colesterol total (21%), comparado ao grupo alimentado com caseína. A adição de isoflavona às dietas controle ou mesmo isolado protéico não influenciou este parâmetro, concluindo que o fator responsável por reduzir o colesterol estaria relacionado a proteína da soja.

No presente estudo, animais alimentados com dieta Icol apresentaram menor concentração plasmática de triacilgliceróis em comparação aos animais alimentados com dieta Ccol. Esses resultados concordaram com estudos que avaliaram o efeito da ingestão de proteína vegetal no metabolismo dos lipídios (MORIYAMA et al., 2003; SHUKLA et al., 2007; FUKUY et al., 2004).

Aoyama et al. (2001), relatou que ratos alimentados com β -conglucina (subunidade 7S globulina da soja) tiveram uma redução nas concentrações plasmáticas de triacilgliceróis de 58% e aqueles alimentados com isolado protéico de soja apresentaram redução de 40%. Fukuy et al. (2004) verificaram redução de 41% em ratos alimentados com β -conglucina. Alguns pesquisadores associam essa redução ao aumento da expressão do PPAR α ou de enzimas cuja expressão gênica é modulada por este fator de transcrição (IRITANI et al., 1996; TOVAR et al., 2005; MORAYAMA et al., 2003).

No caso da soja, há ainda uma grande discussão sobre seu efeito hipocolesterolemizante. Alguns autores atribuem este efeito à sua proteína, relatando que o mesmo pode ser potencializado pela presença de isoflavonas (LIN et al., 2004). Fukui et al. (2004) evidenciaram o efeito da

proteína de soja na redução do colesterol plasmático, demonstrando que esta proteína livre de isoflavona era capaz de responder pelo efeito hipocolesterolemizante em ratos.

Pesquisas realizadas com subunidades isoladas da proteína da soja têm conseguido mimetizar os efeitos da proteína no metabolismo lipídico. Ratos alimentados com dieta hipercolesterolêmica que ingeriram a β -conglucina (subunidade 7S globulina da soja) apresentaram uma redução substancial nos lipídios plasmáticos (DURANTI et al., 2004). Estudos realizados em células hepáticas por Lovati et al. (2000) sugerem que a ativação do LDLR e o aumento da degradação da LDL podem ser induzidas pela globulina 7S (β -conglucina) da soja, reforçando o papel da proteína na redução do colesterol.

4.2.2.3 Colesterol e gordura no fígado

Na figura 7 é apresentada a relação peso do fígado pelo peso corporal dos animais (g/100g de animal) dos diferentes grupos. Os grupos alimentados com proteína isolada de amaranto (associada ou não a 1% colesterol) apresentaram peso do fígado inferior ao dos animais dos grupos com caseína. Esta diferença foi observada nos órgãos dos animais dos grupos logo após a morte (Figura 8), com maior depósito de gordura no fígado dos animais que consumiram caseína, fato que pode estar associado ao aumento no tamanho do órgão dos animais que consumiram essa fonte protéica.

Segundo Trautwein et al. (1993), é desejável que a relação peso do fígado/peso do animal esteja próxima de 3,7%, pois valores maiores estão associados ao maior acúmulo de lipídeos hepáticos. Os resultados mostram que apenas os animais alimentados com dieta contendo proteína de amaranto mantiveram essa relação próxima ao valor tido como desejável.

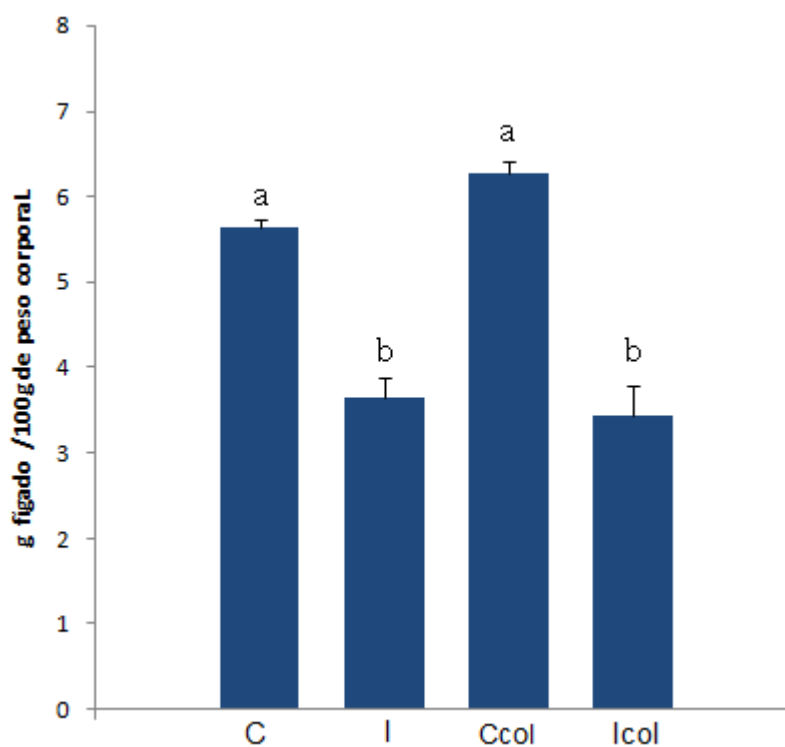


Figura 7. Relação peso do fígado/peso corporal dos animais dos grupos C, I, Ccol e Icol.

Barras com letras iguais não diferem entre si, ANOVA, Tukey ($p \geq 0,05$). Nas colunas está representado o erro padrão. C= Caseína; I = isolado protéico de amaranto; Ccol= caseína + 1% de colesterol; Icol=isolado protéico de amaranto + 1% de colesterol.

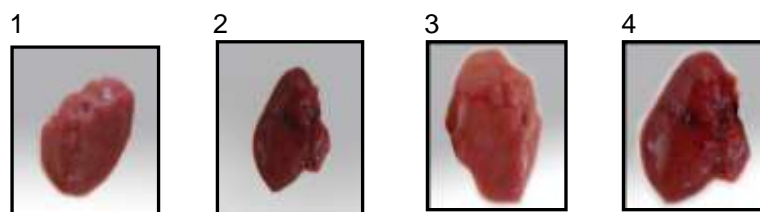


Figura 8. Porções do lobo do fígado dos ratos. 1: C; 2: I; 3: Ccol; 4:Icol.

No quadro 11 estão apresentados os resultados dos teores de colesterol e lipídios totais hepáticos ajustados pelo peso do fígado dos animais.

Quadro 11. Colesterol e lipídios totais do fígado dos animais dos grupos C, I, Ccol e Icol.

Grupo	Colesterol hepático total (mg/g fígado/100g de animal)	Lipídios hepáticos totais (g/g fígado/100g de animal)
C	37,20 (0,27) ^a	0,33 (0,02) ^a
I	16,40 (0,35) ^b	0,18 (0,01) ^a
Ccol	61,90 (0,32) ^c	1,41 (0,11) ^b
Icol	32,30 (0,37) ^a	0,20 (0,03) ^a

Dados expressos como média (erro padrão) de 3 determinações. Letras iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem entre si, ANOVA, Tukey ($p \geq 0,05$). C= Caseína; I = isolado protéico de amaranto; Ccol= caseína + 1% de colesterol; Icol= isolado protéico de amaranto + 1% de colesterol.

Foi verificada uma diferença significativa nos lipídios hepáticos entre os animais dos grupos Ccol e Icol. Os animais dos grupos I e C também apresentaram diferença significativa na concentração de colesterol hepático, sendo que os primeiros apresentaram os menores valores.

Sabe-se que os ratos, quando são alimentados com colesterol, produzem acúmulo deste e de outros lipídios no fígado (WILSON, 1964), o

que leva a um aumento do peso do órgão. No presente estudo, o peso relativo deste órgão foi menor nos animais dos grupos I e Icol, em comparação aos grupos C e Ccol. Desta forma, a proteína isolada de amaranto parece determinar menor acúmulo de colesterol no fígado dos ratos em comparação à caseína, independente da adição de colesterol na dieta.

Em estudos realizados com a proteína da soja foi verificado que a mesma tem efeito protetor contra o depósito de triacilgliceróis no fígado, o que promove redução nos efeitos deletérios causados por excesso de lipídios hepáticos (ASCENCIO et al., 2004). No presente trabalho, as análises de lipídios totais hepáticos mostram que a proteína isolada de amaranto apresenta o mesmo efeito protetor.

O grupo Icol apresentou 48% menos colesterol hepático que o grupo Ccol. Os animais que foram alimentados com a dieta Ccol apresentaram os maiores depósitos de lipídios totais e fração colesterol hepáticos em relação aos demais grupos.

Esses resultados concordam com aqueles relatados por Chatuverdi et al. (1993), que verificaram que ratos alimentados com dieta contendo caseína e 1% de colesterol tiveram peso do fígado em torno de 4,1% do peso corpóreo, ao passo que aqueles que consumiram dieta com amaranto apresentaram menor peso do fígado (3,7%) em relação ao peso corporal. Estes últimos exibiram menor concentração de lipídios totais (38%) e de colesterol (44%) hepático.

Trabalho realizado em hamsters também mostrou menor acúmulo

hepático de lipídios totais e da fração colesterol nos animais alimentados com proteína isolada de amaranto (MENDONÇA et al., 2009).

Fukui et al. (2004) também observaram diferença significativa no tamanho relativo do fígado de ratos alimentados com proteína de soja (4,8%) em relação ao grupo caseína (5,8%).

O consumo excessivo de colesterol pode causar danos ao fígado (BOLKENT et al., 2004). Entretanto, no presente estudo, mesmo a dieta contendo proteína isolada de amaranto com 1% de colesterol mostrou ser eficiente em preservar o órgão do depósito excessivo de lipídios.

Considerando estes fatos, os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os reportados por outros autores, tendo sido observado menor acúmulo da fração colesterol e lipídios totais hepáticos nos animais alimentados com proteína de amaranto, em relação aos animais dos grupos controles alimentados com caseína.

4.2.2.4 Expressão de proteínas relacionadas à síntese do colesterol hepático

Considerando a escassez de trabalhos publicados nesta área, é de interesse conhecer o efeito da ingestão da proteína isolada de amaranto na regulação da síntese do colesterol. Desta forma, a expressão de algumas proteínas-chave desta regulação foram investigadas por “*Western-blotting*”.

Não foi verificada modificação estatisticamente significativa na expressão das proteínas nucleares PPAR α (Figura 9) e LXR α (Figura 10)

entre os grupos C, I, Ccol e Icol. Estes resultados diferem dos encontrados em alguns estudos realizados com outra fonte de proteína vegetal, que verificaram modificação na expressão destas proteínas nucleares (TOVAR et al., 2005; BADGER et al., 2008; SIMMEN et al., 2009).

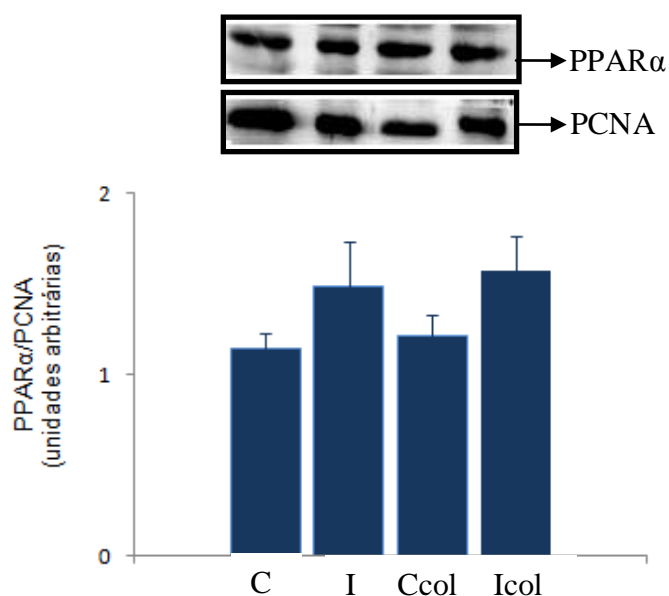


Figura 9. Expressão do PPAR α no fígado (52 kDa). Resultados expressos como média e erro-padrão (n=4). Resultados normalizados por PCNA. C= caseína; I= isolado protéico de amaranto; Ccol= caseína + 1% colesterol; Icol= isolado protéico de amaranto + 1% colesterol. Teste t de Student para variáveis independentes. Testes sem diferenças estatisticamente significativas a nível de $p < 0,05$.

Trabalho realizado com ratos obesos evidenciou o efeito da ingestão da proteína de soja na expressão do receptor nuclear LXR α (TOVAR et al., 2005). Esta investigação mostrou uma redução do depósito de lipídios hepáticos nos animais alimentados com proteína isolada de soja. Os autores atribuíram esse efeito a uma redução na sinalização mediada pelo receptor

LXR α e a um aumento na expressão do PPAR α e na β oxidação de ácidos graxos (TOVAR et al., 2005). Resultados relatados por Badger et al. (2008), estão de acordo e reforçam que a proteína da soja é capaz de ativar a expressão do PPAR α e de aumentar a degradação de ácidos graxos no fígado de camundongos, contribuindo para a redução dos danos gerados pelo acúmulo de gordura hepática.

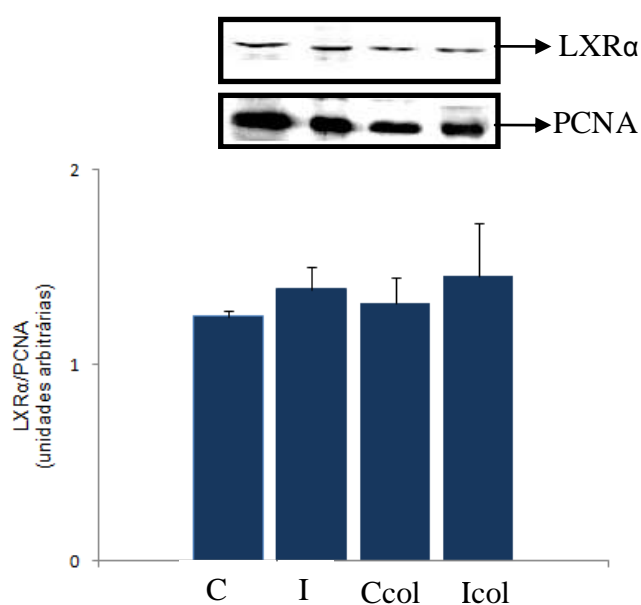


Figura 10. Expressão do LXR α (76kDa) no fígado dos ratos. Resultados expressos como média e erro-padrão (n=4). Resultados normalizados por PCNA. C= caseína; I= isolado protéico de amaranto; Ccol= caseína + 1% colesterol; Icol= isolado protéico de amaranto + 1% colesterol. Teste t de Student para variáveis independentes. Testes sem diferenças estatisticamente significativas a nível de $p < 0,05$.

No presente estudo não houve mudança na expressão do PPAR α , apesar da redução no depósito de lipídios hepáticos dos animais alimentados com proteína de amaranto, um indício de que esta relação parece não ocorrer com a ingestão de proteína de amaranto.

De forma similar, Ronnis et al. (2009) não observaram efeito pela ingestão de proteína da soja desprovida de isoflavonas na expressão do PPAR α em ratos. Os referidos autores atribuíram este fato ao processamento utilizado para extrair os fitoquímicos da proteína da soja, o que pode ter alterado a composição da proteína, determinando resultados diferentes dos encontrados por outros autores.

Diferenças nos procedimentos adotados para o isolamento das proteínas e nos protocolos empregados para conduzir o ensaio biológico (tempo de experimento, modelo biológico, período de jejum) podem ter contribuído para as variações nos resultados relatados por outros autores. Outro fator que dificulta a comparação dos resultados obtidos no presente estudo é a falta de trabalhos realizados com proteína isolada de amaranto nesta área.

Em contrapartida, a análise da expressão das proteínas reguladoras de esteróis SREBP-2 nuclear permitiu verificar uma diferença estatisticamente significativa entre os animais alimentados com dieta Icol e Ccol (Figura 11). Este resultado confirma os relatados por Moriyama et al. (2003) e por Shukla et al. (2007), que descreveram redução significativa na concentração do mRNA da proteína SREBP-2 de ratos alimentados com β -conglícinina e proteína isolada de soja isenta de isoflavonas, respectivamente. Segundo Shukla et al. (2007), a redução na expressão do mRNA do SREBP-2 foi acompanhada pela diminuição na expressão do mRNA das proteínas alvo, no caso, HMG-CoA redutase e LDLR.

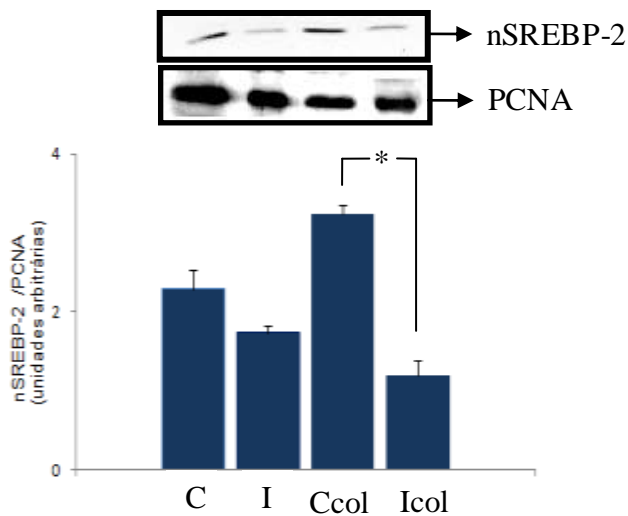


Figura 11 Expressão da forma madura do nSREBP-2 (68kDa). Resultados expressos como média e erro-padrão (n=3). Resultados normalizados por PCNA. C= caseína; I= isolado protéico de amaranto; Ccol= caseína + 1% colesterol; Icol= isolado protéico de amaranto + 1% colesterol. Teste t de Student para variáveis independentes, * = diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Múltiplos fatores estão envolvidos na regulação do SREBP-2 (SHIMANO, 2001), como o Insig; a proteína ativadora da clivagem do SREBP (SCAP) e as proteínas de clivagem S1P e S2P que modulam sua ativação (HORTON et al., 2002). O complexo SREBP/SCAP é retido na membrana do retículo endoplasmático por uma interação do SCAP com o Insig induzida por esteróis. O SCAP media a regulação da retroalimentação da síntese de colesterol por um domínio sensível a esteróis (HORTON et al., 2002). Desta forma, quando a concentração de colesterol celular está baixa, o SCAP é liberado do Insig e transfere o SREBP para o complexo de Golgi, onde a forma madura do SREBP-2 é liberada após a clivagem pelas proteases S1P e S2P (SHIMOMURA et al., 1997; SHIMANO, 2001; HORTON et al., 2002). Posteriormente, a forma madura é translocada para o

núcleo onde codifica a síntese dos genes-alvo envolvidos no metabolismo do colesterol e dos ácidos graxos.

Segundo Goldstein et al. (2002), o aumento do colesterol celular pode bloquear o transporte do complexo SREBP/SCAP do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi, o que impede a ação transcricional do SREBP-2 e, conseqüentemente, reduz a síntese de colesterol (SHIMOMURA et al., 1997; HORTON et al., 2002). Quando as concentrações de colesterol estão elevadas, a quantidade de mRNA de SREBP-2 diminui cerca de 50%, o que sugere que o colesterol controla a concentração de SREBP-2, regulando o processamento de enzimas proteolíticas ou a concentração de mRNA do SREBP-2. Neste último caso, a taxa de produção do precursor do SREBP-2 é afetada (SHIMOMURA et al., 1997).

No presente estudo, os animais dos grupos Icol e Ccol foram alimentados com as mesmas quantidades de colesterol, mas com fontes protéicas diferentes (caseína ou isolado protéico de amaranto). É possível que a redução na expressão do nSREBP-2, observada no grupo Icol em relação ao grupo Ccol, seja decorrente de algum componente da proteína de amaranto e não do aumento do nível de colesterol no fígado, como sugerido por outros pesquisadores (SHIMOMURA et al., 1997; HORTON et al., 2002; GOLDSTEIN et al., 2002).

Uma redução na concentração de colesterol hepático pode diminuir a formação de oxisteróis e, com isso, a expressão do receptor LXR α (TOVAR et al., 2005). Neste estudo, mesmo havendo menor concentração de

colesterol no fígado dos animais dos grupos I e Icol, em relação aos controles C e Ccol, não houve mudança na expressão do LXR α . Portanto a concentração de colesterol hepático observada nos 4 grupos estudados, embora estatisticamente diferente, não teve efeito sobre esse parâmetro.

Horton et al. (2002) sugeriram que uma modificação na razão insulina/glucagon poderia produzir modificações na expressão de genes envolvidos na síntese do colesterol, visto que estes hormônios estão relacionados a biossíntese do colesterol. Considerando que o aumento da concentração de insulina pode estimular a síntese de colesterol via SCAP e ativação do SREBP-2, o inverso, promovido por uma redução nos seus níveis ou da expressão dos genes insulina induzido (Insig-1 e Insig-2), também poderia explicar a redução na expressão de nSREBP-2 observada no presente estudo (SHIMANO, 2001; HORTON et al., 2002). Entretanto, em estudo com camundongos alimentados com β -conglucina, esta relação não foi verificada, uma vez que a redução nos níveis de mRNA do SREBP-2 não foi acompanhada por mudança na concentração de insulina dos animais (MORIYAMA et al., 2003).

Da mesma maneira, SHUKLA et al. (2007) não observaram modificação na expressão do mRNA do Insig-1 e Insig-2, sugerindo que não houve relação entre estes parâmetros. Estes autores concluíram que é possível que não haja relação entre o nível de insulina e a redução do mRNA do SREBP-2 (MORIYAMA et al., 2003), postulando que esta alteração ocorre devido a um efeito na regulação pós-transcricional da forma ativa do SREBP-2 (SHIMANO, 2001; MORIYAMA et al., 2003),

possivelmente envolvendo as proteínas de clivagem.

Segundo Yang et al. (2001), a redução da proteína de clivagem S1P é capaz de inibir a maturação do SREBP em camundongos, o que promove a diminuição: da expressão do SREBP, do colesterol, da biossíntese de ácidos graxos e também da concentração de colesterol plasmático.

Horton et al. (2002) verificaram que, assim como em cultura de células, o SCAP e a proteína de clivagem S1P são necessários para o processamento normal do SREBP no fígado de camundongos geneticamente modificados. Camundongos com deficiência de SREBP no fígado devido a uma interrupção da manifestação do SCAP ou de S1P, apresentaram redução das concentrações plasmáticas de colesterol e de triacilgliceróis. Os autores observaram diminuição da produção e secreção de VLDL, com concomitante redução da expressão de mRNA do LDLR e da depuração de LDL. Dada a menor produção de VLDL, a remoção de colesterol via LDLR foi eficiente, resultando em diminuição da concentração de colesterol plasmático (HORTON et al., 2002).

Estas pesquisas reforçam a importância do papel das proteínas de clivagem na homeostase do colesterol e no controle da sua concentração plasmática. Além disso, mostram que alterações no processo de maturação do SREBP-2 podem afetar o metabolismo lipídico e sugerem que esta via pode ser importante no processo de redução do colesterol plasmático.

No presente estudo, a redução na expressão da proteína nuclear SREBP-2 madura, após a ingestão de dieta Icol, reforça a possibilidade de que o isolado protéico de amaranto possui componente bioativo capaz de

agir no metabolismo endógeno. Este é um indício de que a proteína isolada de amaranto pode ter efeito na via de síntese do colesterol, uma vez que essa redução pode diminuir a expressão dos genes-alvo do nSREBP-2. Contudo, ainda há que se estudar qual é o componente, relacionado ao isolado protéico, responsável pela diminuição na expressão do SREBP-2 nuclear e seu respectivo mecanismo de ação.

Uma vez que não foi observada diferença estatisticamente significativa na concentração plasmática de colesterol entre os animais dos grupos I e Icol, é possível que o efeito da ingestão da proteína de amaranto também esteja associado a uma redução na absorção intestinal do colesterol. Essa menor absorção poderia explicar em parte a menor concentração de colesterol observada no plasma dos animais alimentados com proteína isolada de amaranto em comparação aqueles que receberam caseína na dieta. Contudo, essas são apenas suposições, visto que no presente estudo não foi possível avaliar o efeito da ingestão do isolado protéico de amaranto na excreção fecal de colesterol e de sais biliares.

Considerando que não houve diferença na digestibilidade protéica entre os grupos Icol e Ccol, provavelmente não foi o efeito fibra o responsável pela redução significativa do colesterol plasmático.

Pesquisadores sugerem que o efeito de redução na concentração de colesterol plasmático observado em estudos com proteínas de origem vegetal, pode ser decorrente da ação de peptídeos bioativos formados durante a hidrólise da proteína, que podem agir no metabolismo endógeno influenciando a síntese de colesterol e triacilgliceróis (MORIYAMA et al.,

2003; DURANTI et al., 2004; SHUKLA et al., 2007; SIRTORI et al., 2009; MENDONÇA et al., 2009).

Estudo recente de Lovati et al. (2008), citados por Sitori et al. (2009), mostrou que um oligopeptídeo isolado da proteína da soja foi aparentemente bem absorvido em ratos e um potente ativador do LDLR. As evidências mostram que a proteína da soja é capaz de modular a ativação e o aumento da expressão de LDLR, promovendo aumento na captação e degradação de colesterol pelas células hepáticas (MANZONI et al., 2003; LOVATI et al., 2000). Entretanto, ainda é desconhecido quanto da proteína é transportada para o fígado (AOYAMA et al., 2000).

Embora existam evidências indicando que pequenos peptídeos podem ser absorvidos, permanecendo intactos (SIRTORI et al., 2009), as pesquisas com tais compostos ainda são recentes. Maiores esforços devem se concentrar na tentativa de verificar a possibilidade de absorção destes fragmentos ou ainda de possíveis reações biológicas. Além disto, a identificação e o isolamento destes compostos na proteína de amaranto devem ser realizados, pois os estudos a este respeito ainda são escassos.

Estudos mais detalhados devem ser realizados para determinar os mecanismos relacionados a redução na expressão do SREBP-2 nuclear, correlacionando essa redução com possíveis efeitos na expressão e atividade de proteínas da via de síntese de colesterol hepático, bem como na absorção do colesterol no lúmen intestinal.

Estes resultados concordam com as conclusões de outros pesquisadores que também verificaram efeito hipocolesterolemizante de

proteína de fonte vegetal, como o feijão caupi (FROTA et al., 2008) e o amaranto (MENDONÇA et al., 2009), e reforçam a hipótese de que a redução do colesterol decorre de uma combinação de eventos, possivelmente, relacionados a formação de peptídeos bioativos.

A proteína de amaranto tem potencial para reduzir os danos gerados pela dislipidemia determinada pelo consumo de colesterol em ratos, uma vez que neste estudo foi observada menor concentração de triacilgliceróis e colesterol total no plasma dos animais alimentados com esta proteína. Esses efeitos podem estar associados a formação de peptídeos bioativos, contudo o mecanismo responsável por esse evento ainda não foi elucidado e deverá ser investigado posteriormente.

Estudos futuros devem avaliar a expressão e a atividade enzimática de proteínas alvo do SREBP-2, como a HMG-CoA redutase, pois podem complementar os resultados observados. Além disso, deve-se investigar os efeitos do consumo do isolado protéico de amaranto na expressão de proteínas que regulam a ativação do SREBP-2, como a S1P, SCAP e Insig, de forma a esclarecer o mecanismo envolvido na redução da expressão do nSREBP-2.

5. CONCLUSÕES

Com este estudo pode-se concluir que a ingestão de dieta contendo isolado protéico de amaranto e 1% de colesterol reduz de forma significativa a expressão da proteína nuclear SREBP-2 no fígado de ratos. Essa redução sugere que o efeito hipocolesterolemizante promovido pela proteína de amaranto pode estar relacionado ao metabolismo endógeno do colesterol. Esse efeito independe da ação dos fatores de transcrição PPAR α e LXR α e pode estar associado à formação de peptídeos bioativos, muito embora os mecanismos envolvidos ainda não estejam claros.

O isolado protéico de amaranto apresenta efeito hepatoprotetor, por reduzir o acúmulo de lipídios hepáticos mesmo quando há colesterol na dieta.

A proteína de amaranto pode ajudar no combate às dislipidemias, contribuindo para a redução dos fatores de risco associados às Doenças Cardiovasculares, uma vez que as menores concentrações de triacilgliceróis e colesterol foram observadas no plasma dos ratos alimentados com essa fonte protéica.

6. REFERÊNCIAS

- ABIA – Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação. **Compêndio da legislação de alimentos**. São Paulo. 1992. v2/A, p.7-33
- Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. **Science**. 271(5248):518-520.
- Akosah KO, Gower E, Groon L, Rooney BL, Schaper A Mild hypercholesterolemia and premature heart disease: do the national criteria underestimate disease risk? **J Am Coll Cardiol**. 2000; 35: 1178-84.
- Alberti S, Schuster G, Parini P, et al. Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice. **J Clin Invest** 2001; 107: 565-573
- American Heart Association. 1999 **Heart and Stroke Statistical Update**. Dallas, Tex: American Heart Association; 1998.
- Aoyama T, Fuki K, Takamatsu K, Hashimoto Y, Yamamoto T. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (Yellow KK). **Nutrition**. 2000; 16: 349 – 354.
- Aoyama T, Kohno M, Saito T, Fukui K, Takamatsu K, Yamamoto T, Hashimoto Y, Hirotsuka M, Kito M. Reduction by phytat-reduced soybean conglycinin of plasma triglyceride level of young and adult rats. **Biosci Biotechnol Biochem**. 2001; 65: 1071 – 1075.
- Arazi SS. **Efeito de hipolipemiantes e polimorfismos sobre a expressão dos genes HMGCR, LDLR, SREBF1a, SREBF2, SCAP e NPC1L1 em indivíduos hipercolesterolêmicos**. 2008. [Tese de Doutorado]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- Ascencio C, Torres N, Isoard-Acosta F, Gomez-Perez FJ, Pando R H, Tovar AR. Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. **J Nutr**. 2004;134:522–9.
- Association Official Analytical Chemists (AOAC). **Official methods of**

- analysis.** Washington, 1993.
- Badimon JJ; Badimon L; Fuster V. Regression of atherosclerosis lesion by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. **J Clin Inv.** 1990; 85: 1234-1241
- Badger TM, Ronis M J J, Wolff G, Stanley S, Ferguson M, Shankar P, Simpson CH. Soy Protein Isolate Reduces Hepatosteatosis in Yellow Avy/a Mice Without Altering Coat Color Phenotype. **J Exo Biol Med.** 2008; 233 (10): 1242
- Baum JA, Teng H, Erdman JW, Weigel RM, Klein BP, Persky VW, et al. Long-term intake of soy protein improves blood lipid profiles and increases mononuclear cell low-density-lipoprotein receptor messenger RNA in hypercholesterolemic, postmenopausal women. **Am J Clin Nutr.** 1998;68:545-551
- Becker R, Wheller LE, Lorenz K, Stafford AE, Grosjean OK, Betschart AA. Saunders RMA. A composition study of amaranth grain. **J Food Sci.** 1981; 46:1175-1180.
- Bligh EG e Dyer WJ. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. **Can J Biochem Physiol.** 1959; 37 (8):911-917
- Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding **Anal. Biochem.** 1976; 72: 248.
- Bressani R. The proteins of grain amaranth **Food Rev Int** 1989; 5(1):13-38.
- Brown MS; Goldstein JL. The SREBP Pathway: Regulation of cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. **Cell.** 1997; 89:331-340.
- Brown MS; Kovanen P T; Goldstein JL Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. **Science.** 1981; 212(4495): 628-635.
- Brosseau ME; Hoeg JM. Transgenic rabbits as models for atherosclerosis research. **J Lip Res.** 1999; 40:365-375.
- Bolkent S, Yanardag R, Bolkent S, Doger MM. Beneficial effects of combined treatment with niacin and chromium on the liver of hiperlipidemic rats. **Biol Trace Elem Res.** 2004; 101:219-230.

- Castellani OF, Martýnez EN, Anon MC Globulin-P structure modifications induced by enzymatic proteolysis. **J Agric Food Chem.** 2000; 48: 5624–5629.
- Caster WO, Armstrong WD. Pair feeding as a control procedure in metabolic studies of the x-irradiated rat. **J Nutr.** 1956; 59 (1): 57 -65.
- Chatuverdi A, Saronjini G, Devi NL. Hypocholesterolemic effect of amaranth seeds (*Amaranthus esculatus*). **Plant Food Human Nutr.** 1993; 44: 63-70.
- Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf, D. J. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the x-files. **Science.** 2001;294(5548): 1866-1870.
- Corcos JL, Gonthier C, Zaghini C, Logette I, Shechter E, Bournot P. Hepatic farnesyl diphosphate synthase expression is suppressed by polyunsaturated fatty acids. **Biochem J.** 2005; 385: 787-94.
- Czerwiński J, Bartnikowska E, Leontowicz H, Lange E, Leontowicz M, Katrich E, Trakhtenberg S, Gorinstein S. Oat (*Avena sativa* L.) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) meals positively affect plasma lipid profile in rats fed cholesterol-containing diets. **The J Nutr Biochem.** 2004; 15 (10): 622-629.
- Daley SJ, Klemp KF, Guyton JR, Rogers K A. Cholesterol-fed and casein-fed rabbit models of atherosclerosis. **Atheroscl Tromb.** 1994; 14: 105-114
- Daniels TF, Killinger KM, Michal JJ, Wright RW Jr, Jiang Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis, and cardiac health. *Int. J Biol Sci.* 2009; 5: 474-488 .
- Dietschy JM. Theoretical considerations of what regulates low-density-lipoprotein and high-density-lipoprotein cholesterol. **Am J Clin Nutr.** 1997;65:1281-89.
- Drzewiecki J, Delgado LE, Ratiporn H, Pawelzik E, Martin BO, Park YS, Jung ST, Trakhtenberg S, Gorinstein S, identification and differences of total proteins and their soluble fractions in some pseudocereal based on eletrophoretic patterns. **J Agric Food Chem.** 2003; 51:7798-7804.
- Duane WC. Effects of legume consumption on serum cholesterol, biliary lipids

- and esterol metabolism in humans. **J Lipid Res.** 1997; 38:1120-1126.
- Duarte-Correa A, Joki L, Carrison R. Aminoacid composition of some *Amaranthus* sp grain proteins and its fractions. **Arch Latinoam Nutr.** 1986; 26(3): 466-476.
- Duranti M, Lovati MR, Dani V, Barbiroli A, Scarafoni A, Castiglioni S, Ponzzone C, Morazzoni P. The subunit from soybean 7S globulin lowers plasma lipids and upregulates liver VLDL receptors in rats fed a hypercholesterolemic diet. **J Nutr.** 2004;134: 1334 – 1339.
- Dziuba J, Iwaniak A, Minkiewicz P. Computer-aided characteristics of proteins as potential precursors of bioactive peptides. **Polimery.** 2003; 48 (1); 50–53.
- Escudero NL, Zirulnik NN, Gomez NN, Mucciarelli SI, Gimenez MS. Influence of Protein Concentrate from *Amaranthus cruentus* seedd on the Lipid Metabolism. **Exper Biol Med.** 2006; 231 (1):50-59.
- Fan J, Challah M, Watanabe T. Transgenic rabbit models for biomedical research:Current status, basic methods and future perspectives. **Pathol Int.** 1999; 49: 583-595.
- Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. From molecular action to physiological outputs: Peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. **Prog Lip Res.** 2006;45(2):120 -159.
- Fietz VR, Salgado JM. Efeito da pectina e da celulose nos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos hiperlipidêmicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** 1999; 19: 318-32.
- Food and Agriculture Organization/ World Health Organization. **Protein Quality evaluation.** Roma, 66p. (FAO Food and Nutriotion Paper, 51) 1991.
- Frota KMG, Mendonça S, Saldiva PHN, Cruz RJ, Arêas JAG. Cholesterol-lowering properties of whole cowpea seed and its protein isolate in hamsters. **J Food Sci.** 2008; 73: H235–H240.
- Fukui K, Tachibana N, Fukuda Y, Takamatsu K, Sugano M. Ethanol washing does not attenuate the hypocholesterolemic potential of soy protein.

- Nutrition.** 2004; 20:984-90.
- Goldstein JL, Rawson RB, Brown MS. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. **Arch Biochem Biophys.** 2002; 397:139–148.
- Gorinstein S, Pawelzik E, Delgado LE, Haruenkit R, Weisz M, Trakhtenberg S. Characterization of pseudocereal and cereal protein and aminoacid analyses. **J Food Sci Agric.** 2002; 82:886-891.
- Gorinstein S, Zemser M, Flies A, Shnitman I, Lopez OP, Yamamoto K, Shoichi K, Tanigushi H. Computacional analysis of the amino acid residue sequences of amaranth and some other proteins. **Biosc Biotech Biochem.** 1998; 62(10)1845-1851.
- Grajeta H. Effects of amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds on lipid metabolism in rats. **Bromatol Chemi Toksykol.** 1997; 30:25.
- Horton JD, Bashmakov Y, Shimomura I, Shimano H. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1998; 95:5987–5992.
- Horton J D, Goldstein JL, Brown MS SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **J Clin Invest.** 2002; 109:1125 –1131
- Imeri A, Gonzales JM, Flores R, Elias LG, Bressani R. 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.** 1987; 37: 132-146.
- Iqbal R, Anand S, Ounpuu S, Islam S, Zhang X, Rangarajan S, et al. Dietary Patterns and the Risk of Acute Myocardial Infarction in 52 Countries Results of the INTERHEART Study. **Circulation.** 2008;118(19):1929-37.
- Iritani N, Hosomi H, Fukuda H, Tada K, Ikeda H. Soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in wistar fatty rats. **J Nutr.** 1996; 126: 380-88.
- Katsanids E, Addis PB. Novel HPLC analysis of tocopherols, tocotrienols and cholesterol in tissue. **Free Rad Biol Med.** 1999; 27:1137-1140.

- Kayashita J, Shimoaka I, Nakajoh M, Yamazaki M, Kato N. Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats because of its low digestibility. **J Nutr.** 1997; 127:1935-1400.
- Kitts DD, Weiler K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Curr Pharm Des.** 2003; 9(16): 1309-23.
- König BJ, Koch A, Spielmann J, Hilgenfeld C, Stangl GI, Eder K. Activation of PPAR α lowers synthesis and concentration of cholesterol by reduction of nuclear SREBP-2. **Biochem Pharm.** 2007; 73: 574-585.
- Korhonen H, Pihlanto A. Food-derived bioactive peptides—opportunities for designing future foods. **Curr Pharm Des.** 2003; 9(16):1297–308.
- Kwiterovich PO. The metabolic pathways of high-density lipoprotein low-density lipoprotein and triglycerides: A current review. **Am J Cardiol.** 2000; 21 86(12A):5L-10L.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the heat of bacteriophage T4. **Nature.**1970; 227: 680-85.
- Lehmann JW. Case history of grain amaranth as an alternative crop. *Cereal Foods World.* 1996; 41(5):399-410
- Leite F. **Validação em análise química.** Ed Átomo, Campinas -SP. 3ed., 1998, 224p.
- Li AC, Glass CK. PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. **J Lipid Res.** 2004; 45(12):2161-2173.
- Lin Y, Mejer GW, Vermeer MA, Tratwein EA. Soy protein enhances the cholesterol-lowering effect of plant sterol esters in cholesterol-fed hamsters. **J Nutr.** 2004; 164:143-148.
- Lin CY, Tsai CY, Lin SH. Effects of soy components on blood and liver lipids in rats fed high-cholesterol diets. **Gastroenterol.** 2005; 11(35): 5549-5552.
- Lindström J, Louheranta A, Mannelin M, Rastas M, Salminen V, Eriksson J, et al; Finnish Diabetes Prevention Study Group. The Finnish Diabetes

- Prevention Study (DPS): Lifestyle intervention and 3-year results on diet and physical activity. **Diabetes Care**. 2003;26(12):3230-6.
- Lorgeril M, Salen P. The Mediterranean-style diet for the prevention of cardiovascular diseases. **Public Health Nutr**. 2006;9(1A):118-23.
- Lotemberg AMP. Importância da Gordura Alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arq Bras Endocrinol Metab**. 2009; 53: 595-607.
- Lovati MR, Manzoni C, Gianazza E. Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. **J Nutr** . 2000; 130: 2543–2549.
- Lovati MR, Manzoni C, Corsini A, Granata A, Fumagalli R, Sirtori CR. 7S Globulin from soybean is metabolized in human cell cultures by a specific uptake and degradation system. **J Nutr**. 1996; 126: 2831 – 2842.
- Martínez EN, Castellani OF, Anon MC. Common molecular features among amaranth storage proteins. **J Agric Food Chem**. 1997; 45: 3832–3839.
- Martínez EN, Anon MC. Composition and characterization of amaranth protein isolates An electrophoretic and calorimetric study. **J Agric Food Chem**. 1996; 44: 2523-2530.
- Marcone MF, Niekamp FK, LeMaguer M, Yada RY. Purification and characterization of the physicochemical properties of the albumin fraction from the seeds of *Amaranthus hypochondriacus*. **Food Chem**. 1994; 51: 287–294.
- Manzoni C, Duranti M, Eberini I, Scharnag H, März W, Castiglioni S, Lovati M R. Subcellular localization of Soybean 7S Globulin in HepG2 Cells and LDL Receptor Up-Regulation by Its Constituent Subunit. **J Nutr**. 2003; 133: 2149 – 2155.
- Moriyama T, Kishimoto K, Nagai , Urade R, Ogawa T, Utsumi S, Maruyama N, Maebuchi M. Soybean p-conglycinin diet suppresses serum triglyceride level in normal and genetically obese mice by induction of beta-oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. **Biosci Biotechnol Biochem**. 2004; 68(2): 352 – 359.

- Madani S, Prost J, Belleville J. Dietary protein level and origin (casein and highly purified soybean protein) affect hepatic storage, plasma lipid transport, and antioxidative defense status in the rat. **Nutrition**. 2000; 16:368-375.
- Madani S, Lopez S, Blond JP, Prost J, Belleville J. Highly Purified Soybean Protein Is Not Hypocholesterolemic in Rats but Stimulates Cholesterol Synthesis and Excretion and Reduces Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthesis. **Biochem Mol Biol Nutr**. 1998; 1084-1091.
- McDonough FE, Steinke FH, Sarwar G, Eggum B O, Bressani R, Huth PJ, Barbeau WE, Mitchell G V, Philips J G. In vivo assay for true protein digestibility: collaborative study. **J Assoc Anal Chem**. 1990; 73 (5): 801-805.
- Mendonça, S. **Efeito hipocolesterolemizante da proteína do amaranto (Amaranthus cruentus BRS-Alegria) em hamsters**. São Paulo; 2006 [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].
- Mendonça S; Saldiva OS; Cruz RJ; Arêas JAG.. Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. **Food Chem**. 2009; 116 : 738–742.
- Ministério da Saúde. Prevenção clínica de doença cardiovascular, cerebrovascular e renal crônica. **Cadernos de atenção básica**. 2006; 14:56.
- Nagaoka S, Miwa K, Eto M, Kuzuya Y, Hori G, Yamamoto K. Soy protein peptic hidrolysed with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rat and Caco-2 cells. **J Nutr**. 1999; 129:1725-1730.
- Olfert E, Cross B.M, McWilliam AA. **Guide to the Care and Use of Experimental Animal**. 2 ed., v.1, Canadian Council, 1993.
- Pedersen B, Kalinowski LS, Egum BO. Nutritive value of grain (Amaranthus caudatus L.): 1. Protein and minerals of raw and processed grain. **Plant Foods Hum Nutr**. 1987; 36: 309-24.
- Peet DJ, Turley SD, Ma W, et al. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. **Cell**

- 1998; 93: 693-704.
- Plate AYA, Arêas JAG. Cholesterol-lowering effect of extruded amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) in hypercholesterolemic rabbits. **Food Chem.** 2002; 76: 1-6.
- Price JF, Fowkes FGR. Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease: The epidemiological evidence. **EHJ.** 1997; 18(5):719-727.
- Pupovac J e Anderson HG. Dietary Peptides Induce Satiety via Cholecystokinin-A and Peripheral Opioid Receptors in Rats. **J Nutr.** 2002; 132: 2775–2780.
- Qureshi AA, Lehmann JW, Peterson DM. Amaranth and its oil inhibit cholesterol biosynthesis in 6-week-old female chickens. **J Nutr.** 1996; 126:1972-8.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. **J Nutr.** 1993; 126: 1972-78.
- Ronis MJ, Chen Y, Badeaux J, Badger TM. Dietary Soy Protein Isolate Attenuates Metabolic Syndrome in Rats via Effects on PPAR, LXR, and SREBP Signaling. **J Nutr.** 2009; 1431-1438.
- Rosell MS, Appleby PN, Spencer EA, Key TJ. Soy intake and blood cholesterol concentrations: a cross-sectional study of 1033 pre- and postmenopausal women in the Oxford arm of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. **Am J Clin Nutr** 2004; 80:1391-1396.
- Russel JC, Proctor SD. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. **Cardiol Pathol.** 2006; 15: 318-330.
- Sanchez A, Hubbard RW .Plasma amino acids and the insulin/ glucagon ratio as an explanation for the dietary protein modulation of atherosclerosis. **Med Hypotheses.** 1991; 36: 27– 32.
- Sanchez A, Rubano DA, Shavlik GW, Hubbard R, Horning MC.

- Cholesterolemic effects of the lysine/arginine ratio in rabbits after initial early growth. **Arch Latinoam Nutr.** 1998; 38:229 – 238.
- Santos RD. III diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do departamento de aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol.** 2001; 77(Sup III): 4-48.
- Sarwar G, Ratnayake WMN. Effects of amino acid supplementation of dietary protein on serum cholesterol and fatty acids in rats. **Nutr Res.** 2000; 20 (5): 665-674.
- Saucedo CB, Osuna CJA, Guevara LF, Dominaguez DJ, Paredes LO. Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amaranth (*Amaranthus cruebthus*) seeds. **J Agric Food Chem.** 2002; 50:6515-6520.
- Saunders RM, Becker R. Amaranth: a potential food and feed recourse. **Adv Cereal Sci Technol.** 1984; 6: 39.
- Scilingo AA, Ortiz SEM, Martinez EN, Anon MC. Amaranth protein isolates modified by hydrolytic and thermal treatments. Relationship between structure and solubility. **Food Res Int.** 2002; 35:855-862.
- Segura-Nieto M, de la Rosa APB, Paredes-Lopez O. Biochemistry of amaranth proteins In *Amaranth: biology, chemistry and technology*. Boca Raton: CRC Press; 1994; p75–106.
- Shimomura I, Bashmakov Y, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. Cholesterol feeding reduces nuclear forms of sterol regulatory element binding proteins in hamster liver. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1997; 94: 12354-12359.
- Shimano H. Sterol element binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. **Prog Lipid Res.** 2001; 40:439-452.
- Schultz JR, Tu H, Luk A, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis. **Genes Dev.** 2000; 14: 2831-2838.
- Schneeman M L. High density lipoprotein composition in rats fed casein or soy protein isolate. **J Nutr.** 1984. 114:768-777.
- Shukla A, Brandsch C, Bettzieche A, Hirche F, Stangl G, Eder K. Isoflavone-

- poor soy protein alters the lipid metabolism of rats by SREBP-mediated down-regulation of hepatic genes. **J Nutr Bioch.** 2007; 18: 313–321.
- Silva-Sánchez C, De La Rosa APB, León-Galván MF, Lumen BO, Rodríguez AL, Mejía EG. Bioactive Peptides in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed. **J Agric Food Chem.** 2008; 56: 1233–1240.
- Simmen FA, Mercado CP, Zavackic AM, Huang S A, Greenway A D. Soy protein diet alters expression of hepatic genes regulating fatty acid and thyroid hormone metabolism in the male rat. **J Nutr Biochem.** 2009 (in press).
- Sirtori CR, Galli G, Anderson J W, Arnoldi A. Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Focus on dietary proteins. **Atherosclerosis.** 2009;203:8-17.
- Sirtori, C, R. Lovati, M. R.; Manzoni, C.; Monetti, M.; Pazzucconi, F.; Gatti, E. Soy and cholesterol reduction: clinical experience-1. **J Nutr.** 1995; 125: 598S - 605S.
- Sirtori CR, Even R, Lovati MR. Soybean protein diet and plasma cholesterol: from therapy to molecular mechanisms. **Ann New York Acad Sci.** 1993; 676: 189-201.
- Sirtori CR, Gall G, Lovati MR, Carrara P, Bosisio E, Galli Kienle M. Effects of dietary proteins on the regulation of liver lipoprotein receptors in rats. **J Nutr.** 1984;114: 1493 – 1500.
- Smith SC, Jackson R, Pearson TA, Fuster V, Yusuf S, Faergeman O, Wood DA, Alderman M, Horgan J, Home P, Hunn M, Grundy SM. Principles for national and regional guidelines on cardiovascular disease prevention: a scientific statement from the World Heart and Stroke Forum. **Circulation.** 2004; 109: 3112-3121.
- Soares RAM. **Identificação de peptídeos hipocolesterolemizantes do isolado protéico do grão de amaranto.** São Paulo; 2008 [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].
- Spies JR. Determination of tryptophan in protein. **Anal Chem.** 1967; 39 (9):1412-1425.

- Stangl GI, Weisse K, Dinger C, Hirche F, Brandsch C, Eder K. Homocysteine Thiolactone-Induced Hyperhomocysteinemia Does Not Alter Concentrations of Cholesterol and SREBP-2 Target Gene mRNAs in Rats. **Exp. Biol. Med.** 2007;232:81-87.
- Sugano M, Goto S, Yamada Y, Yoshida K, Hashimoto Y, Matsuo T, Kimoto M. Cholesterol lowering activity of various undigested fractions of soybean protein in rats. **J Nutr.** 1990; 120:977-985.
- Sviridov D, Nestel P. 2002. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. **Atherosclerosis.** 161: 245–254.
- Tachibana N, Matsumoto I, Fukui K, Arai S, Abe K, Takamatsu K. Intake of Soy Protein Isolate Alters Hepatic Gene Expression in Rats. **J. Agric. Food Chem.** 2005; 53: 4253-4257.
- Takao T, Watanabe N, Yuhara K, Itoh S, Suda S, Tsuruoka Y, Nakatsugawa K, Konishi Y. Hypocholesterolemic effect of protein isolated from Quinoa (*Chenopodium Quinoa* WILLD) seeds. **Food Sci Technol Res.** 2005; 11(2):161-7.
- 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.** 1994; 14 (6):885-895.
- Torres, N.; Villavazo-Torre, I.; Tovar A.R. Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implications in diseases by lipid disorders. **J Nutr Bioch** 2006; 17:365-372.
- Tosi EA, Re E, Lucero H, Masciarelli R. Dietary fiber obtained from amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) grain by differential milling. **Food Chem.** 2001; 101:586-587.
- Tovar AR, Villavazo IT, Ochoa M, Elias AL, Ortiz V, Salinas CAA, Torres N. Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hiperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats. **J Lip Res.** 2005; 46(9):1823-1832.
- Trautwein EA, Duchateau GSMJE, Lin Y, Melnikov SM, Molhuizen HOF, Ntanos FY. Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plants sterols. **Eur J Lip Sci Technol.** 2003; 105:171-185.

- Van Der Meer R, Beynen AC. Species-dependent responsiveness of serum cholesterol to dietary proteins. **J Am Oil Chem Soc.** 1987; 64:1172-1177.
- 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.**1986; 8(4):170-7.
- Wilson JD. The quantification of cholesterol excretion and degradation in the isotopic steady state in the rat: the influence of dietary cholesterol. **J Lip Res.** 1964; 5(3): 409-417.
- Wong J, Quinn C M, Brown A. SREBP-2 positively regulates transcription of the cholesterol efflux gene, ABCA1, by generating oxysterol ligands for LXR. **Biochem J.** 2006; 15: 485–491.
- World Health Organization (WHO). **Prevention of Cardiovascular Disease** (2007).Disponível:http://www.who.int/cardiovascular_diseases/guidelines/Full%20text.pdf. Acesso em: março 2010.
- World Health Organization/ Food and Agriculture Organization (WHO/FAO). Joint Who/FAO expert **Consultation on Diet, Nutrition and the Preventin of Chronic Diseases.** 2002.
- Waner T, Nyska A. The influence of fasting on blood glucose, triglycerides, cholesterol and alkaline phosphatase in rats. **Vet. Clin. Pathol.** 1994; 23:78-80.
- Yang J, Goldstein JL, Hammer RE, Moon YA, Brown MS, Horton JD. Decreased lipid synthesis in livers of mice with disrupted Site-1 protease gene. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2001; 98:13607–13612.
- Yabe D, Brown MS, Goldstein JL. Insig-2, a second endoplasmatic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. **PNAS.** 2002; 99:12753-12758.
- Yamamoto, T; Shimano, H; Nakagawa, Y; Ide, T; Yahagi, N; Matsuzaka, T; Nakakuki, M; Takahashi, A; Suzuki, H; Sone, H; Toyoshima, H; Sato,R; Yamada, N. SREBP-1 Interacts with Hepatocyte Nuclear Factor-4 and Interferes with PGC-1 Recruitment to Suppress Hepatic Gluconeogenic Genes. **J Biol Chem.** 2004; 279(13): 12027-35

- Yadav NR, Liener IE. Reduction of serum cholesterol in rats fed vegetable protein or an equivalent amino acid mixture. **Nutr Rep Intern.** 1977;5(4): 385-389.
- Zhang Y, Mangelsdorf DJ. Luxuries of lipid homeostasis: the unity of nuclear hormone receptors, transcription regulation, and cholesterol sensing. **Mol Interv.** 2002; 2 (2):78-87.
- Zhang Z, Wang H, Jiao R, Peng C, Wong YM, Yeung VSY, Huang Y, Chen Z. Coosing hamster but not rats as a model for studying plasma cholesterol-lowering activity of functional foods. **Mol Nutr Food Reser.** 2009; 53: 921-930.
- Zhong F, Liu J, Shoemaker JM, Shoemaker CF. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. **Food Res Intern.** 2007; 40(6):661-667.

7. ANEXO

Anexo I - Aprovação do Comitê de Ética



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



São Paulo, 24 de outubro de 2008.

Ilma

Lilian Carolina Martins de Assis Vaz

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número 026/2008 e intitulado " Efeito do isolado protéico de amaranto (*Amaranthus cruentus* L., BRS-Alegria) na expressão de genes hepáticos de ratos hipercolesterolemicos ", sob a responsabilidade da aluna Lilian Carolina Martins de Assis Vaz sob a orientação do Prof. Dr José Alfredo Gomes Áreas.

Atenciosamente

Dra. Eufrosina Setsu Umezawa

Coordenadora do CEP-IMT

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

8. Currículo lattes

Lilian Carolina Martins de Assis-Vaz

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome em citações bibliográficas Vaz, L.C.M.A
Endereço Profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição
Av. Dr. Arnaldo, 715. Cerqueira César
01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30617858 Fax: (11) 30617705
URL da Homepage:
<http://www.nutricao.fsp.usp.br/funcionais>

Formação Acadêmica/Titulação

2008 Mestrado em Saúde Pública.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Efeito da ingestão de proteína de amaranto no metabolismo do colesterol em ratos
Orientador: José Alfredo Gomes Arêas
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

2002 - 2006 Graduação em Nutrição.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Faculdade de Saúde Pública - FSP

2003 - Atual Vínculo: Pesquisa e Desenvolvimento, Enquadramento funcional: Pesquisa. Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva

Atividades

2007-2008 Projetos de pesquisa, Universidade de São Paulo/ Faculdade de Saúde Pública
Participação em projetos:
Isolado protéico de amaranto (Amaranthus cruentus L, BRS-Alegria): avaliação de suas propriedades funcionais e identificação de peptídeos bioativos

2006 - 2008 Projetos de pesquisa, Universidade de São Paulo/ Faculdade de Saúde Pública
Participação em projetos:
Caracterização da fração protéica do amaranto (Amaranthus cruentus L., BRS_Alegria) e de suas propriedades funcionais.

José Alfredo Gomes Arêas

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome em citações bibliográficas Arêas, J.A.G.
Endereço Profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição
Av. Dr. Arnaldo, 715. Cerqueira César
01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30617858 Fax: (11) 30617705
URL da Homepage:
<http://www.nutricao.fsp.usp.br/funcionais>

Formação Acadêmica/Titulação

- 1986** Livre-docência.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Interrelação entre estrutura e textura de isolados proteicos de pulmão bovino, *Ano de obtenção:* 1986.
Palavras-chave: Propriedades Funcionais; Interação lípide-proteína; Extrusão termoplástica; Espectroscopia de Alimentos; Atividade de água; Proteínas alimentares.
Grande área: Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Tecnologia de Alimentos / *Especialidade:* Aproveitamento de Subprodutos.
Grande área: Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Tecnologia de Alimentos / *Especialidade:* Tecnologia de Produtos de Origem Animal.
Grande área: Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Ciência de Alimentos / *Especialidade:* Propriedades Funcionais de Alimentos.
Setores de atividade: Nutrição e Alimentação; Produção Animal, Inclusive Serviços Veterinários; Fabricação de Equipamentos de Instrumentação Médico-Hospitalares, Instrumentos de Precisão e Ópticos, Equipamentos Para Automação Industrial, Cronômetros e Relógio
- 1990 - 1993** Pós-Doutorado .
University of Oxford.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Biofísica / *Subárea:* Biofísica Molecular.
Grande área: Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Ciência de Alimentos / *Especialidade:* Propriedades Funcionais de Alimentos.
Grande área: Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Ciência de Alimentos / *Especialidade:* Química, Física, Físico-Química e Bioquímica dos Alim. e das Mat-Primas Alimentares.