UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição

Área de Ciência de Alimentos

Gustavo Guadagnucci Fontanari

**Efeito do consumo de tremoço branco (*Lupinus albus*)
e seu isolado protéico no metabolismo do colesterol
em hamsters hipercolesterolemizados**

**ARARAQUARA
2010**

Gustavo Guadagnucci Fontanari

**Efeito do consumo de tremçoço branco (*Lupinus albus*)
e seu isolado protéico no metabolismo do colesterol
em hamsters hipercolesterolemizados**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição, Área de Ciência de Alimentos.

Orientador: José Paschoal Batistuti
Co-orientador: José Alfredo Gomes Arêas

ARARAQUARA
2010

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Fontanari, Gustavo Guadagnucci

F679e Efeito do consumo de tremoço branco (*Lupinus albus*) e seu isolado protéico no metabolismo de colesterol em hamsters hipercolesterolemizados / Gustavo Guadagnucci Fontanari. – Araraquara, 2010.
116 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição.

Orientador: José Paschoal Batistuti

Co-orientador: José Alfredo Gomes Arêas

1.Tremoço – Propriedades funcionais. 2. Isolado protéico. 3. Redução de colesterol. 4. Hamster. I.Batistuti, José Paschoal, orient. II.Arêas, José Alfredo Gomes, co-orient. III. Título.

CDD: 664.0763

CAPES: 50700006

Gustavo Guadagnucci Fontanari

**Efeito do consumo de tremço branco (*Lupinus albus*)
e seu isolado protéico no metabolismo do colesterol
em hamsters hipercolesterolemizados**

Tese de Doutorado

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Departamento de Alimentos e
Nutrição - UNESP- Campus Araraquara**

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Banca examinadora

Presidente: Prof. Dr. José Paschoal Batistuti (FCFAR/UNESP)

Membros

Profa. Dra. Ana Carolina Conti e Silva (IBILCE/UNESP)

Profa. Dra. Deborah Helena Markowicz Bastos (FSP/USP)

Prof. Dr. Elizeu Antonio Rossi (FCFAR/UNESP)

Prof. Dr. Rubens Monti (FCFAR/UNESP)

Dedico esse trabalho à minha família: Napoleão e Gislaine; Ricardo, Otávio e Fernando, que sempre apoiaram e incentivaram essa trajetória; aos meus avós, Oscar e Maura, e aos tios, primos e amigos, que sempre acreditaram.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. José Paschoal Batistuti, pela orientação, incentivo e pela oportunidade de realizar o presente trabalho em conjunto, não medindo esforços para sua realização.

Ao professor Dr. José Alfredo Gomes Arêas, Titular do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP) responsável pelo Laboratório de Bioquímica e Propriedades Funcionais de Alimentos, pela co-orientação prestada e pelo laboratório e estrutura cedida para realizar o trabalho.

Ao professor José Manuel M. Martins da Universidade de Évora (Portugal), pelas sugestões e correções dadas no projeto.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida e ao PADC/FCF (Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas), pelo financiamento do projeto.

Aos professores (Elizeu A. Rossi, Rubens Monti, Taís B. Cesar, João Bosco Faria, Valdir A. Neves e Aureluce Demonte), funcionários (Elizene, Mara, Adriana e Roseli) e colegas de laboratório (Juliana M., Juliana B., Gerson Sasaoka, Ana Paula e Rafaella Possebon) do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR-UNESP) que me apoiaram e ajudaram a realizar esse trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública (Bete, Roseli, Vanessa, Zé Bezerra, Zé Pereira, Regina, Cintia e Alessandra) que dispensaram bastante carinho e atenção durante minha estada na Universidade de São Paulo.

Aos colegas de laboratório pós-doutorandos, doutorandos, mestrandos e ICs do Laboratório de Bioquímica e Propriedades Funcionais de Alimentos: Ana Carolina Conti e Silva, Vanessa Capriles, Karoline Frota, Alice, Lilian Assis, Karen Pacheco, Luila, Adriana, Catarina Ribas, Olívia, Ludmila, Márcia, Sr. Bastos e em especial a técnica de laboratório Rosana Manólio Soares, por ser muito prestativa na execução das análises bem como em suas discussões.

Ao professor Dr. Paulo H. Saldiva, que contribuiu com a parte de histologia, orientando nos procedimentos de montagem das lâminas, nas leituras e interpretação dos resultados.

Aos funcionários do Biotério do Instituto de Medicina Tropical, Centro de Bioterismo da USP, INCOR e companheiros de campo: Luis Mundel, Carlinhos, Vilma, Renato, Luciano, Robison Cruz, Luíza, Orlando, Márcio Chaves e Edson.

À professora Dr. Hiro Goto por ceder o Biotério do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo para a realização do experimento animal.

À Deus, por ter concedido muita força, coragem, vontade e saúde.

Resumo

Introdução: A soja e outras leguminosas são consideradas alimentos funcionais por apresentarem propriedades hipocolesterolemizantes. Esta propriedade, porém, ainda não foi elucidada para o tremoço e seus isolados protéicos. Um possível componente deste grão responsável pelo efeito redutor de colesterol é sua proteína. **Objetivo:** Produzir isolado protéico de tremoço e verificar a influência do grão integral e de seus isolados protéicos no metabolismo do colesterol de hamsters hipercolesterolemizados pela dieta. **Métodos:** O isolado protéico (IP) de tremoço foi produzido por precipitação isoelétrica, utilizando-se pH 10,0 para solubilização da proteína e pH 5,0 para sua precipitação, obtendo-se um isolado protéico de 92,41% de proteína. O IP e a farinha de tremoço integral (FI) foram usados como fonte protéica em dietas experimentais para hamsters que tiveram hipercolesterolemia induzida por dieta contendo 13,5% de gordura saturada e 0,1% de colesterol, por 21 dias. Os animais foram divididos em 3 grupos, recebendo cada grupo dieta com 20% de caseína (controle), dieta com 20% de proteína respectiva do IP e dieta com 20% de proteína respectiva da farinha integral de tremoço (FI), por 28 dias. **Resultados:** Comparando-se a dieta controle (HC), as dietas IP e FI provocaram reduções significativas no colesterol total (15,3 e 16,88%, respectivamente) e colesterol não-HDL (28,6 e 43,41%, respectivamente). Análises histológicas do fígado foram realizadas e observou-se que o IP e o FI apresentaram efeito hepatoprotetor comparado à HC, que apresentou esteatose difusa e intensa (nível 4+), enquanto que os grupos tremoço integral e isolado protéico apresentaram esteatose focal (nível 1). Alguns possíveis mecanismos envolvidos para o efeito benéfico no metabolismo lipídico foram investigados. A excreção de colesterol fecal foi inversamente proporcional aos níveis plasmáticos do colesterol dos animais submetidos às diferentes dietas. Os animais com a dieta FI apresentaram maior excreção de ácidos biliares e colesterol nas fezes, valores estatisticamente diferentes aos dos animais da dieta com caseína. **Conclusões:** O tremoço e seu isolado protéico reduziu os níveis de colesterol total e colesterol não-HDL, e proporcionaram efeito

hepatoprotetor. A excreção de ácidos biliares e colesterol nas fezes não estão relacionados com a redução do colesterol provocado pelo IP. O mecanismo envolvido na redução do colesterol nesse experimento ainda não está totalmente elucidado, sugerindo que a proteína isolada do tremço atue na síntese enzimática de colesterol.

Palavras-chave: tremço, isolado protéico, esteatose, metabolismo lipídico, alimento funcional.

Abstract

Introduction: Soya and other legume seeds are considered functional food because of their hypocholesterolemic properties. However this property was still not elucidated for lupine and its protein isolates. A possible component of this grain responsible for the redactor effect of cholesterol is its protein. **Objective:** Produce lupine isolate and verify the influence of the whole grain and its protein isolate on cholesterol metabolism in diet hipercholesterolemized. **Methods:** The lupin protein isolate (PI) was produced by isoelectric precipitation, using pH 10.0 for solubilization of the protein and pH 5.0 to its precipitation, obtaining a protein isolate of 92.41% of protein. The PI and lupine flour whole (FW) were used as source of protein in experimental diets for hamsters that had hipercholesterolemia induced by a 21 days diet containing 13.5% of saturated fat and 0.1% of cholesterol. The animals were divided into 3 groups, receiving each group a 28 days diet with 20% of casein (Control), diet with 20% of protein of protein isolate of lupine (PI) and diet with 20% of protein from lupine whole flour (WF). **Results:** Comparing the control diet (HC), the diets PI and WF caused significant reductions in total cholesterol (15.3 and 16.88%, respectively) and cholesterol not-HDL (28.6 and 43.41%, respectively). Histological analysis of liver were accomplished and noticed that the PI and the WF presented hepatoprotector effect compared to HC, which presented diffuse and intense steatosis (level 4+), while the groups whole lupine and protein isolate, presented focal steatosis (level 1). Some possible mechanisms for the beneficial effects in lipid metabolism were investigated. The excretion of fecal cholesterol was inversely proportional to the plasmatic levels of the animals cholesterol submitted to the different diets. The animals with the WF diet presented a bili acids and cholesterol larger excretion in the feces, statistically different from those of animals with casein diet. **Conclusions:** Lupine and its protein isolate reduced the total cholesterol and not-HDL cholesterol levels, and provide hepatoprotector effect. The bile acids and cholesterol excretion in feces are not related to the cholesterol reduction caused by PI. The mechanism

involved in the cholesterol reduction in this experiment is not yet totally elucidated, suggesting that the lupine isolate protein act in the enzymatic synthesis of cholesterol.

Words-key: Lupine, protein isolate, steatosis, lipid metabolism, functional food.

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1 – Fluxograma da obtenção do Isolado Protéico (IP) a partir da farinha de tremçoço.....	39
Figura 2 – Animais dispostos em gaiolas individuais.....	45
Figura 3 – Fluxograma do delineamento experimental durante as etapas do recebimento até o sacrifício dos animais	49
Figura 4 – Gaiolas especiais para coleta de fezes.....	53
Figura 5 – Curvas de solubilidade da proteína da farinha de tremçoço em função do pH e concentração de sal, em temperatura ambiente (25 ± 3) °C.....	61
Figura 6 – Perfil eletroforético das proteínas de tremçoço.....	65
Figura 7 – Curvas DSC para: A) IPs com NaCl 0,3M e B) IPs contendo Na ₂ SO ₃ e NaCl 0,5M.....	70
Figura 8 – Concentração de colesterol total (mg/dL) no plasma dos hamsters.....	78
Figura 9 – Concentração de triglicerídeos (mg/dL) no plasma dos hamsters.....	80
Figura 10 – Concentração de colesterol HDL (mg/dL) no plasma dos hamsters.....	81
Figura 11 – Concentração de colesterol não-HDL (mg/dL) no plasma dos hamsters.....	82
Figura 12 – Fotomicrografia de secções de 5µ de espessura do fígado coradas com HE em aumento de 400X em hamsters do grupo caseína.....	92

Figura 13 – Fotomicrografia de secções de 5µ de espessura do fígado coradas com HE em aumento de 400X em hamsters do grupo isolado protéico.....	93
---	----

Figura 14 – Fotomicrografia de secções de 5µ de espessura do fígado coradas com HE em aumento de 400X em hamsters do grupo farinha integral de tremço.....	94
---	----

Lista de Tabelas

Pág.

Tabela 1 – Composição centesimal de tremçoço (<i>Lupinus albus</i> var. <i>Multolupa</i> e <i>L. Albus</i> var. <i>Marta</i>).....	28
Tabela 2 – Necessidades nutricionais de hamsters (NCR, 1995).....	45
Tabela 3 – Composição planejada das dietas utilizadas no experimento biológico expressos em g/kg.....	47
Tabela 4 – Composição centesimal da farinha integral e desengordurada do tremçoço.....	57
Tabela 5 – Perfil de ácidos graxos do tremçoço branco (<i>Lupinus albus</i>) expressos em porcentagens.....	59
Tabela 6 – Rendimento e conteúdo protéico dos isolados protéicos obtidos em diferentes condições experimentais de extração.....	63
Tabela 7 – Entalpia e temperatura de pico para IPs obtidos em diferentes condições de extração.....	68
Tabela 8 – Perfil de aminoácidos do tremçoço branco (<i>Lupinus albus</i>) e do isolado protéico (g de aminoácido/100g de proteína), comparados com a recomendação da WHO/FAO/UNU (2002).....	72
Tabela 9 – Composição das dietas utilizadas no experimento biológico, representadas em g/100g de dieta em base seca.....	73
Tabela 10 – Perfil de ácidos graxos das dietas experimentais utilizadas no experimento biológico.....	74
Tabela 11 – Dados fisiológicos e peso relativo do fígado dos hamsters alimentados com diferentes dietas experimentais.....	76
Tabela 12 – Perfil lipídico dos hamsters alimentados com diferentes dietas	

ricas em colesterol contendo caseína, IP e FI no momento final do experimento.....	83
---	----

Tabela 13 – Digestibilidade verdadeira (%) das proteínas presente nas dietas utilizadas no experimento biológico.....	85
---	----

Tabela 14 – Excreção fecal de colesterol e ácidos biliares, peso das fezes dos hamsters alimentados com diferentes dietas experimentais.....	89
---	----

Tabela 15 – Escore de esteatose hepática e respectivos significados clínicos.....	91
---	----

Lista de abreviações e siglas

ACAT – Acyl-CoA colesterol Acyl Transferase

AGI – ácido graxo insaturado

AGS – ácido graxo saturado

Al – alumínio

apo B – apoproteína B

Arg - arginina

CE – capacidade de emulsificação

CEA – coeficiente de eficácia alimentar

CLAE – cromatografia de alta eficiência

CT – colesterol total

Cys - cisteína

DSC – calorimetria exploratória diferencial

DV – digestibilidade verdadeira

FAI – fibra alimentar insolúvel

FAO – Food and Agriculture Organization

FAS – fibra alimentar solúvel

FI – dieta hipercolesterolêmica com farinha integral

H – hidrogênio

HC – Dieta hipercolesterolêmica com caseína

HCl – ácido clorídrico

HDL – lipoproteína de alta densidade

HE – Hematoxilina-eosina

HMG-CoA – Hidroximetil glutaril coenzima A

IP – isolado protéico

kDa – quilodalton

LDL – lipoproteína de baixa densidade

Lys – lisina

Met – metionina

N₂ – nitrogênio

NaCl – cloreto de sódio

NRC – National Research Council

Phe - fenilalanina

pI – ponto isoelétrico

SDS – dodecilsulfato de sódio

SREBP – Sterol Regulatory Element Binding Protein

TG – triglicerídeos

Tris – Tampão hidroximetil aminometano

Tris/HCl – tampão

Tyr – tirosina

VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade

Vol. – volume

Lista de símbolos

% - porcentagem

Φ - diâmetro

β - razão de aquecimento

Δm – perda de massa

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

cm – centímetros

g - gramas

H_2O – água

kDa – kilodaltons

L – litro

M – mol

mg – miligrama

m_i – massa inicial

mL – mililitro

mm – milímetro

nm – nanômetro

T – temperatura

V – volts

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

Pág.

1- INTRODUÇÃO	20
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 – Aspectos gerais do metabolismo lipídico	23
2.2 – Dislipidemias	26
2.3 – Papel da dieta	27
2.4 – Tremçoço branco (<i>Lupinus albus</i>)	29
2.5 – Modelos animais	34
3 – OBJETIVOS	36
3.1 – Objetivo geral	36
3.2 – Objetivos específicos	36
4 – MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 – MATERIAL	37
4.2 – MÉTODOS	37
4.2.1 – Obtenção da matéria prima: farinha integral e desengordurada	37
4.2.2 - Influência do pH e concentração de sal na solubilização	

da proteína.....	38
4.2.3 – Produção do isolado protéico (IP).....	38
4.2.4 – Caracterização da matéria prima e do IP.....	40
4.2.4.1 – Composição centesimal.....	40
4.2.4.2 – Fibra alimentar.....	40
4.2.4.3 – Perfil de aminoácidos na farinha e IP de tremço.....	40
4.2.4.4 – Perfil de ácidos graxos na farinha integral e rações.....	41
4.2.4.5 – Eletroforese.....	42
4.2.5 – Análise térmica, obtenção das curvas DSC.....	43
4.2.6 – Experimento biológico.....	43
4.2.6.1 – Animais.....	44
4.2.6.2 – Dietas.....	45
4.2.6.3 – Delineamento experimental.....	48
4.2.6.4 – Coeficiente de eficácia alimentar.....	50
4.2.6.5 – Análises no plasma.....	51
4.2.6.6 – Fígado.....	52
4.2.6.7 – Fezes dos hamsters.....	52
4.2.6.7.1 – Digestibilidade da proteína.....	53
4.2.6.7.2 – Colesterol das fezes.....	54
4.2.6.7.3 – Ácidos biliares.....	55
4.2.7 – Análise histológica.....	55
4.2.8 – Análises estatísticas.....	56
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 – Caracterização da matéria prima e do isolado protéico (IP).....	57
5.1.1 – Composição centesimal das farinhas.....	57

5.1.2 – Perfil de ácidos graxos na farinha de tremoço branco.....	59
5.1.3 – Curva de solubilidade da farinha descorticada e desengordurada (FDD) de tremoço.....	61
5.1.4 – Obtenção e otimização de produção dos isolados protéicos (IPs).....	63
5.1.5 – Perfil eletroforético da farinha e dos IPs.....	64
5.1.6 – Calorimetria diferencial exploratória (DSC) dos IPs.....	67
5.1.7 – Perfil de aminoácidos da farinha de tremoço e do IP.....	71
5.2 – Experimento biológico.....	73
5.2.1 – Composição das dietas experimentais.....	73
5.2.2 – Consumo da dieta e dados fisiológicos dos animais.....	75
5.2.3 – Perfil lipídico.....	78
5.2.4 – Digestibilidade verdadeira.....	84
5.2.5 – Teores de colesterol e ácidos biliares nas fezes.....	86
5.2.6 – Análise histológica.....	90
6 – CONCLUSÃO.....	95
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
ANEXOS	
ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista.....	114
ANEXO 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.....	116

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, na década de 30, as doenças infecciosas e parasitárias correspondiam, proporcionalmente, a 46% da mortalidade geral, enquanto que as cardiovasculares a 12%. Entretanto, dados de 2001 mostram uma nítida reversão desses dados: enquanto as infecciosas e parasitárias respondem por 5% de todas as causas de morte, as doenças cardiovasculares ascenderam a 31% (BARBOSA, 2003).

Atualmente a hipercolesterolemia e implicações de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose, são os maiores problemas enfrentados na saúde pública e merecem muita atenção, sendo a intervenção dietética um procedimento muito importante de prevenção e até mesmo de tratamento desse estado clínico (KERCKHOFFS et al., 2002; JOHNSON et al., 2006).

As doenças cardiovasculares tornaram-se uma das principais causas de morte, em consequência, entre outros fatores, das profundas transformações no abastecimento de alimentos e padrão alimentar, com o rápido aumento da produção e consumo das gorduras saturadas, que tornou as dietas mais calóricas, bem como a redução na atividade física cotidiana (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1982).

A ingestão de uma dieta desequilibrada pode ter um impacto superior a 30% no desenvolvimento das doenças cardiovasculares, 35% no desenvolvimento de câncer e 50% no desenvolvimento da obesidade (HOLM, 2003).

A associação entre o consumo alimentar e benefícios terapêuticos em certas doenças crônicas não é recente. Este princípio tem recebido atualmente uma atenção renovada e o interesse dos consumidores no papel dos denominados alimentos funcionais tem crescido exponencialmente. Todos os alimentos podem ser considerados funcionais por proporcionarem sabor, aroma ou valor nutritivo, no entanto, o conceito de alimentos funcionais foi criado no Japão nos anos 80 (HASLER, 2002), e tem sido aplicado durante a última década aos alimentos que apresentem componentes bioativos benéficos para a saúde em sua composição (THOMAS; EARL, 1994).

Estudos epidemiológicos e ensaios em humanos, em animais e *in vitro* indicam que dietas baseadas no consumo de vegetais podem reduzir o risco de doenças crônicas (CRAIG, 1997; ANDERSON; MAJOR, 2002; JONES, 2002; FROTA et al., 2008), particularmente de doenças cardiovasculares. Esta ação é exercida por substâncias químicas biologicamente ativas, como os fitoquímicos, porém, vários outros nutrientes que compõe a leguminosa, como óleo, proteína, fibra, fitoesteróis e saponinas, também são apontadas como responsáveis por exercer esse efeito (POTTER, 1995; DURANTI; GIIUS, 1997; DURANTI, 2006; SIRTORI et al., 2009; ROY et al., 2010).

Dentre as leguminosas a soja é a que mais recebe estudos relacionando seu consumo com o efeito de reduzir o colesterol total sérico e o LDL-C, que são os principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares (ANDERSON et al., 1995; FUKUI et al., 2004; REYNOLDS et al., 2006).

Recentemente, várias outras leguminosas, como a ervilha, lentilha, grão de bico, feijões e o tremoço, tem recebido bastante atenção pelo grande

potencial despertado na prevenção de desordens lipídicas (SIRTORI et al., 2004; DURANTI, 2006; SMITH et al., 2006). Esses estudos sugerem vários componentes presentes nas leguminosas que justificam tal efeito, como as fibras, agindo por complexação e as proteínas presentes nessas leguminosas (DURANTI, 2006).

As proteínas das leguminosas, além de serem componentes energéticos e construtivos (aminoácidos), também podem ser precursoras de peptídeos biologicamente ativos com várias funções fisiológicas (DURANTI, 2006). Dentre as leguminosas, o tremço é a que possui maior conteúdo protéico em sua composição (MARTÍNEZ-VILLALUENGA et al., 2006).

Com base nas evidências levantadas da literatura ligando o tremço a propriedades hipocolesterolêmicas e dada a semelhança das características estruturais de sua proteína com as proteínas da soja (já reconhecida como um componente nutracêutico), justifica-se o estudo do efeito hipocolesterolêmico da farinha integral e do isolado protéico de tremço (*Lupinus albus*), utilizando hamsters como modelo experimental, a fim de evidenciar se a proteína presente no tremço causa o efeito funcional ao organismo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais do metabolismo lipídico

Os lipídeos estão envolvidos no abastecimento e no armazenamento de energia, são precursores da síntese de hormônios, componentes da bile e da membrana celular. Aproximadamente 98 % da gordura dos alimentos se encontram na forma de triglicerídeos, formados por uma molécula de glicerol, esterificada a três ácidos graxos, denominados saturados, monoinsaturados, poliinsaturados e trans (LOTTENBERG, 2009).

A dieta nos países ocidentais fornece de 30 a 40 % das calorias na forma de gordura e aproximadamente 300 mg de colesterol, e apenas 50 % do colesterol presente no lúmen intestinal é absorvido (LORGERIL; SALEN, 2006).

A gordura de origem alimentar e endógena são transportadas no plasma por meio de lipoproteínas, constituídas por lipídeos neutros, como colesterol-éster e triglicérides, em seu núcleo hidrofóbico. As lipoproteínas se classificam em quilomícrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL-C), de densidade intermediária (IDL-C), de baixa densidade (LDL-C) e de alta densidade (HDL-C). No plasma são continuamente remodeladas durante o trânsito no compartimento plasmático, através da ação de enzimas e de proteínas de transferência (WANG, 2006; DANIELS et al., 2009).

O papel fundamental dos quilomícrons e das VLDL-C é transportar, respectivamente, os triglicérides alimentares e os de síntese hepática (gordura endógena). As LDL-C são as principais lipoproteínas transportadoras de

colesterol proveniente do fígado para os tecidos periféricos. As HDL-C são responsáveis pela remoção do colesterol de tecidos periféricos e de outras lipoproteínas, enviando-os ao fígado, o que caracteriza o denominado “transporte reverso de colesterol” (KURUSHIMA et AL., 1995).

Os triglicérides provenientes da gordura são hidrolisados pela lipase gástrica, intestinal e pancreática, gerando ácidos graxos que são absorvidos pelas vilosidades intestinais e reesterificados, formando di e triglicerídeos. Estes se ligam à apolipoproteína B48 e, juntamente com o colesterol da dieta, da bile e vitaminas lipossolúveis, são transportados através dos quilomícrons, formado nas células epiteliais no intestino delgado.

Os triglicérides dessa partícula são então hidrolisados pelas enzimas lipoproteína lipase periférica (LLP) e lipase hepática (LLH) (MAHLEY; HUANG, 2007). A LLP é uma glicoproteína presente nas células endoteliais voltada para luz capilar e seu cofator de ativação é a apoC II (LOOKENE et al., 2004). A LLH é produzida no hepatócito e localizada no endotélio dos capilares sinusoides. Hidrolisa triglicerídeos e fosfolípidos, mas sua ação preponderante é agir como fosfolipase sobre as partículas de HDL-C (RADER; JAYE, 2000).

Com essas alterações, têm origem, no espaço vascular extra-hepático, os remanescentes de quilomícrons, rapidamente absorvidos pelo fígado, via receptores, reconhecidos pelos receptores de LDL-C (receptor B/E), que identificam a apoE.

Os lípidos captados pelo fígado são, em parte, secretados para a circulação sob a forma de VLDL-C. Aproximadamente 75% dos triglicerídeos das VLDL são hidrolisadas pela LLP e LLH e se transformam em

remanescentes (IDL-C). Uma parte menor de IDL-C é captada pelo fígado e o restante transforma-se em LDL-C pela ação da LLH (RADER; JAYNE, 2000).

Em condições normais, as LDL-C são responsáveis pelo transporte de 65 a 70 % do conteúdo plasmático total de colesterol. A maior parte das LDL-C é removida da circulação pelo fígado e o restante, por tecidos extra-hepáticos. Estas se ligam a receptores celulares, resultando em um complexo LDL-receptor, que é internalizado e degradado no fígado (MAHLEY; HUANG, 2007).

A concentração plasmática de colesterol é regulada pelos receptores B/E. As apo B100 e apoE, presentes na superfície dessas partículas, interagem com os receptores e facilitam sua internalização. O aumento do conteúdo intracelular de colesterol induz menor síntese dos receptores LDL-C. Concomitantemente, ocorre inibição da atividade da hidroximetil-glutaril: coenzima A redutase (HMG-CoA redutase). O inverso ocorre em situações baixa de concentração de colesterol (LOTTENBERG, 2009).

O colesterol proveniente da dieta (exógeno) também pode influenciar na homeostase de colesterol sérico. A diminuição da absorção intestinal de colesterol, mediada através de proteínas transportadoras e enzimas (NPC1L1, ABCG5/G8 e ACAT), pode estimular a conversão de colesterol hepático em ácidos biliares e também a síntese de novo colesterol através da enzima HMG-CoA, favorecendo o catabolismo de LDL-C, com o respectivo aumento de receptores LDL-C (WANG, 2006).

2.2 Dislipidemias

As dislipidemias são distúrbios metabólicos que afetam os níveis das lipoproteínas circulantes no sangue, caso neste quadro seja aumentado o nível sérico de colesterol, pode-se dizer que o indivíduo tem uma hipercolesterolemia. As dislipidemias podem estar associadas a fatores de origem genética, ou sob influência de fatores ambientais, como tabagismo, sedentarismo, dieta desequilibrada e abuso de álcool. Se for resultante de ações medicamentosas ou forem consequência de alguma doença de base (diabetes, insuficiência renal, etc...), são consideradas dislipidemias secundárias (QUINTÃO; NAKANDAKARE, 1996).

Baixos níveis de HDL colesterol (HDL-C) contrapostos com elevadas concentrações plasmáticas de triglicérides e LDL colesterol (LDL-C) estão consistentemente relacionados com aumento do risco de eventos cardiovasculares (CASTELLI et al., 1986; CULLEN, 2000; DESPRÉS et al., 2000).

Grande parte do colesterol circulante é sintetizada no próprio organismo, entretanto aproximadamente 1/3 é proveniente da dieta (STIPANUK, 2000). O controle da concentração sérica do colesterol ocorre principalmente através da regulação da captação das LDL's, que é uma das principais transportadoras do colesterol endógeno do fígado para a corrente sanguínea. O aumento da quantidade de LDL's (mensurado pela sua proteína apoB-100), bem como o aumento da quantidade de colesterol que as mesmas carregam, representam igualmente um quadro de risco para a gênese da aterosclerose por serem

depositadas na íntima da parede arterial e ocasionando processos inflamatórios (DIETSCHY, 1997; MARCHESI et al., 2008; SIRTORI et al., 2009).

O fígado é o órgão mais importante na homeostase do colesterol, responsável pela excreção do mesmo via bile, através da conversão de colesterol em ácidos biliares ou da secreção direta de colesterol biliar. O fígado também produz VLDL-C e é o principal sítio catabólico de LDL-C mediado por receptores de LDL-C, e responsável pela síntese endógena de colesterol através da enzima HMG-CoA redutase (DANIELS, et al., 2009).

Níveis sanguíneos de colesterol elevados, especialmente do colesterol das LDL-C, têm sido positivamente correlacionados com o risco de doenças cardiovasculares. A diminuição da colesterolemia com vista a minorar tais riscos, é uma prioridade há muito tempo (ANDERSON et al., 1984; CARROL, 1991; KERCKHOFFS et al., 2002).

2.3 Papel da dieta

Uma das formas de controle dos níveis de colesterol plasmático é a mudança de hábitos alimentares. Embora o colesterol da dieta não represente um fator considerável do nível plasmático de colesterol, devido aos mecanismos de controle de sua síntese, vários outros componentes podem colaborar para o controle desse nível (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 1998).

Componentes da dieta têm sido relacionados a um efeito hipocolesterolêmico, como as fibras solúveis, perfil de ácidos graxos,

substâncias antioxidantes e as proteínas de origem vegetal (POTTER, 1995; DURANTI, 2006; SIRTORI et al., 2004).

Pelo fato das fontes protéicas de origem animal possuírem ácidos graxos saturados e colesterol em sua composição, recomenda-se o consumo de proteína de origem vegetal, uma vez que suas fontes não contém colesterol e possuem propriedades nutracêuticas que auxiliam na redução dos níveis de colesterol, diminuindo assim os riscos de doenças coronarianas e diabetes (FIETZ; SALGADO, 1999; KERCKHOFFS et al., 2002; SIRTORI et al., 2004; MAGNI et al., 2004; MARTINS et al., 2005; D'AGOSTINA et al., 2006).

De acordo com Martínez-Villaluenga et al. (2006), os grãos de leguminosas são as principais fontes de proteína vegetal e dentre eles o tremoço é o que apresenta maior conteúdo protéico, sendo também boa fonte de fibras (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Composição centesimal do Tremoço (*L. albus* var. *Multolupa* e *L. albus* var. *Marta*)*, em base seca.

Componentes nutricionais	<i>L. albus</i> var. <i>Multolupa</i>	<i>L. albus</i> var. <i>Marta</i>
	Sementes íntegras	Sementes íntegras
Proteína	30,6 ± 0,26	37,4 ± 3,12
Lipídios	14,64 ± 1,11	11,34 ± 0,73
Cinzas	3,65 ± 0,29	3,79 ± 0,06
Carboidratos solúveis		
Sacarose	2,58 ± 0,06	3,09 ± 0,08
Fibra dietética		
Solúvel	5,21 ± 0,18	3,64 ± 0,12
Insolúvel	34,22 ± 0,08	30,80 ± 0,11
Fibra total	39,42 ± 0,26	34,44 ± 0,23
Amido		
Total	3,27 ± 0,23	2,81 ± 0,08
Disponível	1,78 ± 0,11	1,84 ± 0,13

* Os resultados estão expressos em g/100g; Fonte: Martínez-Villaluenga et al. (2006).

2.4 Tremoço branco (*Lupinus albus*)

As sementes de tremoço branco (*Lupinus albus*) são utilizadas como alimento há mais de 3.000 anos pelas populações mediterrânicas. Atualmente o incentivo para sua produção se deve ao conteúdo protéico de cerca de 30-40%. Desta forma o tremoço apresenta grande potencial de consumo *in natura* ou de isolados e concentrados protéicos (SATHE et al., 1982; SÁNCHEZ-VIOQUE et al., 1999; LQARI et al., 2002; RODRÍGUEZ-AMBRIZ et al., 2005; D'AGOSTINA et al., 2006), e também na agricultura para a fixação de nitrogênio no solo (HUYGHE, 1997). Além disso, o tremoço pode ser cultivado em regiões de diversos climas, como o Mediterrâneo, a América do Sul, a Austrália e a Nova Zelândia (ALLEN, 1998; MULAYIM et al., 2002).

Em 2008, a produção mundial de tremoço foi de 790 mil toneladas (FAO, 2008), das quais Portugal produziu apenas 15 toneladas. O maior produtor mundial de tremoço, que se pode cultivar desde o fim do outono até ao início de verão, é a Austrália com cerca de 61% do total, seguida do Belarus (10,3%), Alemanha (6,3%) e Chile (4%).

O tremoço branco (*Lupinus albus* L.) é uma leguminosa do gênero *Lupinus*, família Fabaceae, tribo Genisteae. De acordo com Huyghe (1997), existem quatro espécies para o gênero: *albus*, *angustifolius*, *luteus* e *mutabilis*. Estas espécies são direcionadas para a alimentação humana justamente por apresentarem elevado conteúdo de proteína, lipídeos e fibras (**Tabela 1**). A variação do conteúdo protéico entre as espécies cultivadas de tremoço é o

resultado das diferentes características de condições de crescimento e tipo de solo (PETTERSON et al., 1997).

A proteína do tremço possui duas frações majoritárias, albuminas e globulinas, na proporção de 1:9, respectivamente. Quanto às globulinas, estas se dividem em duas classes predominantes, as frações globulinas 7S e globulinas 11S, seguidas das frações congutinas β e α , respectivamente (BLAGROVE; GILLESPIE, 1975).

A quantidade de lipídeo presente no grão varia entre as espécies, em torno de 6-15%, com alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados (BENEYTOUT et al., 1987; MUSQUIZ et al., 1989). As frações de fibra solúvel e insolúvel abrangem um total entre 34-40%, praticamente o dobro da soja (21,7%), ervilha (18%) e feijão faba (19%) (VAN BARNEVELD, 1999).

Para a utilização dessas sementes, estudos são realizados avaliando suas propriedades físico-químicas e potencial de aplicabilidade industrial, na forma de concentrados ou isolados protéicos, como ingrediente alimentício em alimentos processados (SATHE et al., 1982; EL-ADAWY et al., 2001; LQARI et al., 2002; RODRÍGUEZ-AMBRIZ et al., 2005). O uso de extratos, concentrados ou isolados protéicos pela indústria, permite garantir aos alimentos processados boas propriedades sensoriais, agregando maior valor nutricional ao produto (SÁNCHEZ-VIOQUE et al., 1999).

Além de objetivar a aplicabilidade industrial, as proteínas de diferentes espécies de tremço também vêm recebendo atenção especial por apresentarem propriedades nutracêuticas (DURANTI, 2006; SMITH et al., 2006; SIRTORI et al., 2009). Pesquisas recentemente realizadas permitiram

observar o controle de hiperglicemia (MAGNI et al., 2004) e hiperlipidemia (SIRTORI et al., 2004; HALL et al., 2005; MARTINS et al., 2005; SPIELMANN et al., 2007; VIVEROS et al., 2007; BETTZIECHE et al., 2008; MARCHESI et al., 2008), demonstrando que essa proteína exerce efeito funcional no organismo.

Estudos em humanos e modelos animais são realizados com vista a avaliar o efeito da ingestão de sementes, leguminosas ou seus componentes na redução da colesterolemia e se obter um melhor entendimento destes processos (MATHUR et al., 1964; SHUTLER et al., 1987; KINGMAN, 1991; KINGMAN et al., 1993; WANG; MCINTOSH, 1996; PLATE; ARÊAS, 2002). A maioria dos estudos que testaram o efeito hipocolesterolêmico do consumo de leguminosas comprovou tal aptidão, mesmo quando as dietas à base de leguminosas ou seus componentes eram comparadas com dietas isoprotéicas e isoenergéticas (ANDERSON et al., 1984; KINGMAN et al., 1993; ANDERSON; MAJOR, 2002). Diversos componentes são apontados como os responsáveis pelo efeito hipocolesterolêmico desses alimentos, como as suas frações protéicas e respectivos perfis de aminoácidos (KIM et al., 1978; KRITCHEVSKY, 1979), as frações lipídicas e as fibras (SHUTLER et al., 1987), as saponinas (OAKENFULL; FENWICK, 1978; SIDHU et al., 1987) e os fitoesteróis (CARR et al., 2002). No entanto, os mecanismos subjacentes a este efeito ainda são pouco conhecidos e inconclusivos.

Martins et al. (2005) utilizando semente integral de tremço azul (*Lupinus angustifolius* L.) em porcos intactos e anastomizados, observaram efeito hipocolesterolêmico. Esse efeito foi atribuído ao mecanismo de não

absorção intestinal de colesterol e sais biliares, provavelmente devido aos fitoesteróis e fibras presentes nas sementes. Resultados similares também foram relatados para outras leguminosas, como o feijão faba (*Vicia faba*) (MACARULLA et al., 2001) e para a soja (LIN et al., 2004).

Hall et al. (2005) relataram diminuição de níveis de LDL-C e CT (colesterol total), através de alimentos com adição de farinha de tremço atribuindo seu efeito às fibras dietéticas presentes no cotilédone do grão. Entretanto Sirtori et al. (2004) observaram a redução de LDL-C e colesterol total em ratos consumindo extrato protéico de tremço com recurso a técnicas de gavagem. No entanto, seus dados são incompletos visto não apresentarem resultados lipídicos hepáticos e fecais, impossibilitando uma melhor interpretação de um possível mecanismo. Porém, administrando fração protéica específica e analisando as células hepáticas *in vitro*, os autores relataram aumento significativo da atividade dos receptores de LDL-C, o que sugere potencial de aplicação com maior enfoque em modelo experimental adequado.

Spielman et al. (2007) observaram, em ratos alimentados com proteína de tremço, a redução da concentração plasmática de triglicerídeos atribuindo o efeito a uma redução da expressão da proteína ligadora/transportadora de esterol. Outros trabalhos usando proteína de tremço também relatam diminuição de colesterol em ratos (BETTZIECHE et al., 2008) e também em coelhos (MARCHESI et al., 2008), ambos atribuindo o efeito a um possível mecanismo ligando receptores envolvidos na síntese e transporte de colesterol, devido a frações específicas presentes na proteína.

Tentativas têm sido feitas para explicar os mecanismos pelo qual a proteína de origem vegetal altera a concentração plasmática de colesterol total e colesterol das LDL (BEYNEN, 1990; CARROL, 1991). Potter (1995) fez importante revisão sobre estes mecanismos e cita que um possível aumento da excreção de ácidos biliares afeta a atividade da enzima HMG-CoA redutase, ao modular o metabolismo do colesterol com vista à biossíntese de novos ácidos biliares. Por outro lado, os aminoácidos resultantes da digestão das proteínas de origem vegetal (leguminosas) modulam a secreção de certos hormônios (insulina, glucagon e hormônios tireoideanos), as quais parecem estar relacionadas com o efeito hipocolesterolêmico.

Ácidos biliares são sintetizados no fígado a partir do colesterol (HALL et al., 1988). Vários estudos sugerem que ácidos biliares reagem no trato gastrointestinal com substâncias poliméricas, formando complexos que acarretam a não absorção. Este é um mecanismo muito efetivo na redução dos níveis plasmáticos de colesterol, diminuindo assim os riscos de doenças cardiovasculares (FIETZ; SALGADO, 1999). Com os ácidos biliares complexados a outras frações de alimentos, sua reabsorção fica comprometida, o que estimula o fígado a converter colesterol em ácidos biliares (YOSHIE-STARK et al., 2004). Alguns trabalhos relatam a complexação dos ácidos biliares com as fibras (PANDOLF; CLYDESDALE, 1992; KRITCHEVSKY, 1995), entretanto, mecanismo semelhante também foi atribuído ao efeito de proteínas (KAHLON; WOODRUFF, 2002) na parte da fração não digerível.

Duranti et al. (2004) estudando o efeito da administração da fração protéica 7S da soja em ratos, relataram que ocorre um aumento da expressão de receptores de LDL-C hepático, aumentando sua atividade e consequentemente diminuindo os níveis de colesterol total e triglicérides plasmáticos.

Apesar dos dados da literatura serem otimistas quanto aos benefícios causados pela ingestão de sementes de leguminosas e proteínas de origem vegetal, são também inconclusivos, o que nos incentiva a continuar buscando o entendimento do efeito hipocolesterolêmico da proteína de origem vegetal. No presente trabalho, pretende analisar-se o efeito do consumo de farinha integral e do isolado protéico de tremçoço branco (*Lupinus albus*) cultivado no Brasil, no metabolismo do colesterol de um modelo animal parecido com o humano.

2.5 Modelos animais

Para o presente trabalho foi necessário ajustar um modelo que correspondesse à resposta de hipercolesterolemia em curto prazo de tempo, de porte pequeno, a fim de agilizar um manuseio de grande número de animais em um pequeno espaço físico, e que ingerisse uma quantidade moderada de ração, devido à dificuldade de obtenção do isolado protéico, tudo isso aliado a uma semelhança no metabolismo lipídico do homem.

Os hamsters transportam uma significativa porção de colesterol plasmático, cerca de 50 %, nas frações de lipoproteínas LDL, sendo mais semelhantes aos humanos que outros roedores (LOCK et al., 2005). Em função

disso, o animal vem sendo muito usados em trabalhos sobre metabolismo lipídico por responder em consistentemente à modulação de dietas ricas em colesterol, e devido a seus perfis de lipoproteínas serem muito mais semelhantes ao do homem quando comparado a animais de porte equivalente, como ratos e camundongos (BATHENA et al., 2009).

De acordo com os levantamentos acima, indicando o hamster como melhor animal para o estudo em questão, e o fato de não haver na literatura relatos do efeito do consumo do tremoço integral e seus isolados protéicos no metabolismo do colesterol desses animais, optou-se por utilizar esses animais nesse protocolo experimental.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do consumo de tremço branco (*Lupinus albus*) integral e seu isolado protéico no metabolismo do colesterol de hamsters, evidenciando as alterações na composição lipídica sanguínea.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 – Isolar a proteína do tremço de modo a obter um bom rendimento e pureza e não alterar a proporção entre as frações protéicas ou aminoácidos presentes no grão *in natura*;

3.2.2 – Determinar a composição de aminoácidos da farinha de tremço integral e de seu isolado protéico;

3.2.3 – Determinar a digestibilidade verdadeira das proteínas da farinha de tremço integral e de seu isolado protéico;

3.2.4 – Avaliar o efeito da dieta com a substituição total da fonte protéica de origem animal pela proteína presente na farinha integral de tremço branco no metabolismo do colesterol evidenciando a composição lipídica sanguínea;

3.2.5 – Avaliar o efeito da dieta com a substituição total da fonte protéica de origem animal pelo isolado protéico de tremço branco no metabolismo do colesterol evidenciando a composição lipídica sanguínea.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

As sementes de tremçoço branco (*Lupinus albus*) foram obtidas no Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) – PR - Londrina. A partir das sementes de tremçoço branco foram obtidos os materiais de estudo, ou seja, a farinha integral e o isolado protéico.

4.2 Métodos

4.2.1 - Obtenção da matéria prima: farinha integral e desengordurada

As sementes de tremçoço foram submetidas a tratamento com água potável aquecida até atingir 50°C por 3 vezes ao dia durante 5 dias, para a remoção dos alcalóides, sendo descartada a água resultante de cada aquecimento. O lote de farinha integral foi obtido por trituração em moinho de martelos com peneira de saída de 0,4 mm de diâmetro, acondicionado em sacos de polietileno selados e mantidos em geladeira (5 a 10°C) até à sua utilização.

Num segundo lote, as sementes foram descorticadas manualmente e após trituradas, seguindo a metodologia de moenda descrita acima. Posteriormente a farinha descorticada foi desengordurada a frio com hexano na proporção de 1:5 (massa/volume) sob agitação constante por 1 hora, seca em

estufa ventilada com temperatura ambiente por 24 horas, homogeneizada e acondicionada em sacos de polietileno selados e mantidos em geladeira (5 a 10°C) até à sua utilização.

4.2.2 - Influência do pH e concentração de sal na solubilização da proteína

A solubilidade da farinha e do isolado protéico, foi determinado seguindo o método descrito por Wang e Kinsella (1976). Amostras de 1 g de farinha com teor de proteína conhecido foram dispersas em água destilada, na proporção massa-volume 1:20. O pH da suspensão foi ajustado ao valor desejado com HCl e/ou NaOH, o material foi agitado por 1 hora a velocidade constante e temperatura ambiente (25 ± 3 °C). Após esse tempo o material foi centrifugado a 10.000 x g por 60min; do sobrenadante foram colhidas alíquotas para a determinação do nitrogênio solúvel pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995). Para a avaliação do efeito combinado da concentração de NaCl e da variação do pH na extração da proteína, as amostras foram dispersas em água destilada com a proporção de 0,5 e 1,0M de NaCl e o mesmo procedimento foi realizado.

4.2.3 - Produção do Isolado Protéico (IP)

A **Figura 1** apresenta as etapas para a produção do IP. O rendimento de extração foi calculado e o conteúdo protéico determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995).

Figura 1 – Fluxograma da obtenção do Isolado Protéico (IP) a partir da farinha de tremçoço, seguindo o procedimento de Liadakis et al. (1995).

O IP foi obtido a partir da farinha de tremçoço desengordurada de acordo com metodologia descrita por Liadakis et al. (1995) modificado. A modificação foi referente à extração, realizada por agitação mecânica na proporção 1:20 (massa/volume), em soluções de NaCl variando entre 0 a 1 mol L⁻¹, com ajustes de pH empregando solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹, em temperatura ambiente (25°C ± 3), por 30 minutos. A suspensão foi centrifugada a 10.000 x

g/30 min. O sobrenadante foi recolhido em bquer e a protena precipitada em pH isoeltrico com a adio lenta de HCl 0,5 mol L⁻¹. A suspenso de protena foi submetida nova centrifugao a 10.000 x g/30 min. O precipitado foi separado do sobrenadante, tratado com gua, o pH ajustado a 7,0 e posteriormente liofilizado e homogeneizado.

4.2.4 – Caracterizao da Matria-Prima e do IP

4.2.4.1 – Composio Centesimal

As anlises de umidade, cinzas, extrato etreo e protena da farinha de tremoo integral e dos IPs, foram realizadas de acordo com a metodologia da AOAC (1995). O teor de carboidratos foi calculado por diferena.

4.2.4.2 – Fibra Alimentar

A anlise de fibra solvel e insolvel foi realizada de acordo com o mtodo enzimtico gravimtrico de PROSKY et al. (1988).

4.2.4.3 – Perfil de aminocidos na Farinha e IP de Tremoo

A composio de aminocidos da farinha integral e do IP de tremoo foi determinada por cromatografia de troca inica e reao ps coluna com

ninidrina. A técnica é baseada na hidrólise da proteína (tomada de amostra que contenha o equivalente a 25 mg de proteína) em meio ácido (10 mL HCl 6N, sob vácuo, à temperatura de 110°C por 22 horas). Posteriormente, os aminoácidos hidrolisados foram recuperados em tampão citrato de pH 2,2. Uma alíquota de 25 µL foi injetada no analisador de aminoácidos Dionex DX-300 para separação dos aminoácidos. O produto dessa reação foi registrado em um colorímetro sob a forma de pico e quantificado pelas áreas de cada pico. As áreas dos picos obtidos a partir das amostras investigadas foram comparadas com uma mistura padrão de aminoácidos.

Os valores de triptofano foram determinados por espectrofotometria usando-se hidrólise enzimática com pronase a 40°C por 24 horas. A amostra hidrolisada foi submetida à reação colorimétrica com p-dimetilamino benzaldeído (DAB) e posterior leitura espectrofotométrica a 590 nm. O triptofano foi então calculado a partir de uma curva padrão.

Estas análises foram realizadas no laboratório de análise química LabTec (Laboratório de alta tecnologia) em Campinas.

4.2.4.4 – Perfil de ácidos graxos na farinha integral e rações

Os ácidos graxos foram determinados como ésteres metílicos de ácidos graxos através de cromatografia gasosa (CG). A farinha integral e as rações experimentais tiveram seus lipídeos extraídos através de técnica descrita por Bligh e Dyer (1959). A formação de metil ésteres de ácidos graxos seguiu-se o método sugerido por Hartman e Lago (1973).

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por CG, em equipamento “Chrompack” CP9002 (Middelburg, Holand) acoplado a um computador equipado com o software Maestro I, versão 2.3. As condições cromatográficas foram: coluna capilar de sílica fundida CIOLA-WAX, com 20m de comprimento e 0,32mm de diâmetro interno; gás de arraste: hidrogênio a 2,0mL/min; injetor “splitter” a 270°C, com razão de “split” de 1:35; detector FID a 300°C; programação da coluna: temperatura inicial de 60°C, com elevação de 3,5°C/min até 240°C. O volume injetado de cada extrato no cromatógrafo a gás foi de 1µL e a identificação foi por comparação do tempo de retenção corrigido de ésteres metílicos dos ácidos graxos das amostras e padrões.

Para identificação dos picos, foi utilizado como padrão o *Lipid Standard SIGMA – Fatty acid methyl ester mixtures* 47885. A análise foi qualitativa, sendo a proporção de cada ácido graxo calculado dividindo-se a área do seu pico pela área total da corrida.

4.2.4.5 – Eletroforese

A eletroforese SDS-PAGE foi conduzida de acordo com procedimento descrito por Laemmli (1970). Em cada poço foram aplicados 50 µg de proteína proveniente da farinha integral e do IP. A amperagem foi fixada em 20 mA para cada gel de 1,0 mm e 15 mA para géis de 0,75 mm; voltagem auto-ajustável, até o máximo de 300V. Após corrida, os géis foram corados em solução de Azul de Comassie R Brilhante 0,025% em 40% de metanol e 7% de ácido acético e descorados no mesmo solvente sem o corante. O marcador utilizado

foi o PageRuler Unstained Protein Ladder da Fermentas (#SM0661), com massas moleculares de 10 a 200 kDa.

Para a análise do gel, foi utilizado um software Gelworks 1D advanced® da UVP (Cambridge, UK), sendo a massa molecular calculada por comparação com os padrões e a similaridade das amostras por comparação de migração das bandas eletroforéticas.

4.2.5 - Análise térmica, obtenção das curvas DSC

As curvas DSC foram obtidas em um calorímetro DSC-25, acoplado ao processador TC-15, METTLER, em atmosfera dinâmica de ar (100 mL min^{-1}), usando cadinho de alumínio tampado e perfurado ($\Phi=1 \text{ mm}$), massa da amostra de 3 mg/proteína e razão de aquecimento de $10 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

4.2.6 – Experimento biológico

O ensaio biológico foi desenvolvido no biotério de experimentação para hamster do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT-USP).

O protocolo experimental seguiu as normas do *Canadian Council Animal Care* (OLFERT et al., 1993). Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FCF/CAr (protocolo CEP/FCF/CAr n° 16/2009) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical

(CEP-IMT 054/2009), local onde foi desenvolvido todo o experimento biológico (ANEXO I e II).

4.2.6.1 – Animais

Neste estudo, foram utilizados Hamsters (*Mesocricetus auratus*), raça Golden Syrian, machos, recém-desmamados, com padrão sanitário convencional, proveniente do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP).

Os animais foram dispostos em gaiolas individuais (**Figura 2**), em local arejado com temperatura em torno de 20 a 25 °C, umidade relativa de $\cong 55\%$ sendo expostos à ciclos de claro e escuro de 12 horas cada. Os animais foram alimentados *ad libitum* e pesados periodicamente para avaliar variações de peso e crescimento. A ração foi pesada e trocada todos os dias para verificar a quantidade ingerida por cada animal.

Os procedimentos cirúrgicos, coleta de material biológico e ou sacrifício, foram realizados nos animais em jejum de 12h, previamente anestesiados via intraperitoneal com Rompum® (cloridrato de xilazina: 10 mg/kg peso) e Ketalar® (cloridrato de ketamina: 100 mg/kg de peso). A coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca e a eutanásia por exsanguinação, também sob anestesia. As seringas foram lavadas com heparina antes da coleta, e foram adicionados 10µL de heparina Heptar® (5.000UI/mL) nos microtubos (eppendorf) onde o sangue foi acondicionado para posteriores análises.

Figura 2 – Animais dispostos em gaiolas individuais.

4.2.6.2 – Dietas

As dietas foram formuladas de acordo com as recomendações nutricionais da *National Research Council* (NRC, 1995), para hamsters em fase de crescimento (**Tabela 2**), contendo mistura de vitaminas e minerais adequadas ao crescimento dos animais de acordo com Reeves et al. (1993).

Tabela 2 – Necessidades nutricionais de hamsters alimentados *ad libitum*

Nutrientes	g/ kg de ração
Carboidratos	650
Lipídios	40 a 200
Proteínas	180 a 240
Fibras	50 a 150
Mistura vitamínica**	10
Mistura de minerais**	35

Fonte: NRC, 1995; **Reeves et al., 1993.

A dieta utilizada para induzir a hipercolesterolemia seguiu o mesmo modelo adotado no Laboratório de Bioquímica e Propriedades Funcionais da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP) em experimentos que já demonstraram bons resultados para esse efeito, contendo os seguintes agentes hipercolesterolemizantes: 13,5 % de gordura de coco e 0,1 % de colesterol (FROTA et al., 2008).

As dietas experimentais foram acrescidas dos elementos hipercolesterolemizantes sendo sua distinção na fonte protéica. A composição planejada do experimento biológico está apresentada na **Tabela 3**.

As dietas foram suplementadas com aminoácidos limitantes segundo recomendações da AIN-93 (REEVES et al., 1993) e NCR, 1995. Desta forma, analisando o conteúdo de aminoácidos presente na farinha e no isolado protéico de tremço, foi necessário adicionar metionina, triptofano e lisina para atingir suas recomendações.

As dietas foram formuladas de forma a serem isocalóricas, isoprotéicas e isolipídicas, e de modo a fornecer as mesmas quantidades de colesterol e cloreto de colina. Para isso foi preciso adequar as dietas tendo como referência os nutrientes presentes na farinha integral de tremço, de forma que ficassem com as mesmas quantidades desses nutrientes em todas as dietas, portanto foi necessário suplementar as dietas caseína e IP com óleo de soja e fibras a fim de ficarem isolipídicas e isocalóricas em relação à dieta FI.

Tabela 3 – Composição planejada das dietas utilizadas no experimento biológico expressas em g/kg

Ingredientes (g/kg)	Caseína	Isolado (IP)	Tremoço (FI)	Aprotéica
Caseína ¹	237,2	0	0	0
Farinha de tremoço integral	0	0	548,3	0
Isolado protéico de tremoço	0	216,4	0	0
L-metionina	4,2	4,2	4,2	0
Triptofano	1,8	1,8	1,8	0
Lisina	4,3	4,3	4,3	0
Sacarose	50	50	50	50
Amido de milho	155,8	171,45	156,10	340,25
Maltodextrina	51,9	57,15	52	113,35
Celulose microcristalina	244	244	0	244
Óleo de soja	67,5	67,5	0	67,5
Gordura de coco	134,3	134,3	134,3	134,3
Colesterol	1	1	1	1
Cloreto de colina	3	3	3	3
Mistura vitamínica ²	10	10	10	10
Mistura mineral ²	35	35	35	35
Energia total (kCal/kg dieta) ³	4905,7	4892,4	4892,5	4936,8

[1] 843,1 g/caseína kg (analisado em laboratório); [2] Reeves et al., 1993; [3] proteína x 4, carboidrato x 4, lipídios x 9.

Para se obter rações peletizadas, foi necessário adicionar à dieta amido de milho e maltodextrina na proporção de 3:1 respectivamente. Essas proporções foram definidas a partir das dietas padrões para roedores em fase de crescimento (REEVES et al., 1993).

Também foi necessário um lote de ração aprotéica, isenta de proteína, para realizar o estudo de digestibilidade de proteína presente no tremoço e seus isolados protéicos assim como das rações experimentais utilizadas no experimento. As dietas experimentais foram produzidas pela Empresa de Biociências Prag & Soluções Ltda.

Para o período de aclimatização utilizou-se ração comercial Nuvilab CR1 (Nuvital) tendo em sua composição, declarada pelo fabricante, proteína mínima 22%, extrato etéreo mínimo 4%, matéria mineral máxima 10%, matéria fibrosa máxima 8% e umidade máxima 12,5%.

4.2.6.3 – Delineamento Experimental

A **Figura 3** apresenta o fluxograma do delineamento experimental, contendo as etapas detalhadas dos processos.

O experimento foi iniciado com 24 hamsters machos, recém desmamados. Após 7 dias de aclimação, recebendo ração comercial, foram sorteados 6 animais para coleta de sangue (procedimento de coleta descrito no item 4.2.6.1), para posteriores análises plasmáticas referente ao período basal.

Após essa fase todos os animais passaram a receber a dieta hipercolesterolemizante por um período de 21 dias (tempo necessário para hipercolesterolemizar os animais), novamente realizou-se coleta de sangue em 6 animais, de acordo com a média de peso e excluindo os animais que já sofreram coleta na fase basal, a fim de realizar novas análises plasmáticas referente ao período hipercolesterolemia.

Finalizando a fase de hipercolesterolemia, os animais foram divididos em 3 grupos (n=8), de modo que o peso médio dos grupos fossem semelhantes. A partir daí, durante 28 dias, cada grupo passou consumir uma dieta experimental diferente, sendo:

Figura 3 – Fluxograma do delineamento experimental durante as etapas de recebimento até o sacrifício dos animais.

1. **Grupo Controle “HC”** (Hipercolesterolemizante): teve como fonte protéica 20% de caseína, adicionada de 0,1% de colesterol e 13,5% de gordura saturada na forma de gordura de coco;
2. **Grupo Isolado Protéico “IP”**: teve como fonte protéica 20% de isolado protéico de tremço, adicionada de 0,1% de colesterol e 13,5% de gordura saturada na forma de gordura de coco;
3. **Grupo Farinha Integral FI”**: teve como fonte protéica 20% de proteína proveniente da farinha de tremço integral, adicionada de 0,1% de colesterol e 13,5% de gordura saturada na forma de gordura de coco.

Decorridos 14 dias após a introdução das dietas experimentais, coletou-se o sangue de 6 animais de cada grupo, de acordo com o peso médio, para posteriores análises plasmáticas. Finalmente após 28 dias de dietas experimentais todos os animais tiveram sangue coletado e foram sacrificados por exsanguinação.

Durante o período experimental os animais tiveram água e dietas *ad libitum*, salvo os que antecederam os procedimentos cirúrgicos, esses tiveram restrição, apenas da dieta, por 12 horas.

4.2.6.4 - Coeficiente de Eficácia Alimentar

Através dos pesos dos animais e da ingestão alimentar, monitorados durante o experimento, foi calculado o Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA), utilizando a equação abaixo:

$$CEA(\%) = \left(\frac{Gp}{Ca} \right) \times 100$$

Onde:

Gp = Ganho de peso;

Ca = Consumo alimentar.

4.2.6.5 – Análises no Plasma

As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Propriedades Funcionais de Alimentos da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP), seguindo o padrão analítico recomendado para perfil lipídico pelo *National Cholesterol Education Program* (WARNICK et al., 1995).

O teor de triglicérides no plasma foi determinado através de kit enzimático comercial (Labtest[®], Minas Gerais, Brasil) contendo as enzimas lipase da lipoproteína, glicerolquinase, glicerol-3-fosfato peroxidase (SOLONI, 1971).

O colesterol total (CT) foi determinado através de kits comerciais (Labtest[®], Minas Gerais, Brasil) baseado no método enzimático colorimétrico (CHOD/PAP) com colesterol esterase, colesterol oxidase e 4-aminoantipirina.

O HDL-C (colesterol presente na lipoproteína de alta densidade) foi quantificado após precipitação das lipoproteínas que contém apolipoproteína B (VLDL e LDL) seguida da quantificação do colesterol presente no sobrenadante. O agente precipitante foi o ácido fosfotúngstico/cloreto de

magnésio (PTA/MgC12) (ABELL et al., 1952). Este método já foi validado para aplicação em plasma de hamsters (WEINGARD; DAGGY, 1990).

A fração não HDL (LDL-C + VLDL-C) foi calculada pela subtração do colesterol total (CT) pelo HDL-C (DORFMAN et al., 2003).

4.2.6.6 – Fígado

O fígado foi retirado após o sacrifício dos animais por ocasião da última coleta de sangue. Após a sua imersão em solução fisiológica, o excesso de umidade do órgão foi retirado por absorção em papel filtro. O fígado foi posteriormente pesado em balança analítica e armazenado em solução de formaldeído (10 %) para posterior obtenção dos cortes de histologia.

4.2.6.7 – Fezes dos hamsters

Para a coleta das fezes dos hamsters, realizada do 23° ao 27° dia de experimento, foi necessário uma gaiola adaptada (**Figura 4**). Uma caixa com maravalha no fundo era coberta com uma tela de aço inox que permitia a passagem da urina e ao mesmo tempo as fezes permaneciam retidas. Uma outra caixa teve seu fundo cortado para a adaptação de uma grade, essa caixa foi encaixada na primeira de modo que o animal não ficasse em contato com suas fezes.

Após dois dias de adaptação às gaiolas, as fezes dos animais foram coletadas e pesadas, acondicionadas em frascos de polietileno e congeladas.

Figura 4 – Gaiolas especiais para coleta de fezes, no detalhe, a tela de aço inox com fezes retidas.

Posteriormente a coleta total, as fezes foram submetidas a secagem em estufa com circulação de ar, com temperatura de 45 – 50 °C, durante 24 horas. Após esse período as fezes foram pesadas, trituradas, homogeneizadas e armazenadas a -20 °C até análise.

4.2.6.7.1 – Digestibilidade da Proteína

A digestibilidade verdadeira (DV) foi calculada medindo-se a quantidade de nitrogênio ingerido na dieta, a quantia excretada nas fezes durante o experimento e a perda metabólica no material fecal determinada no grupo aprotéico (WHO/FAO/UNU, 2002), utilizando a equação abaixo:

$$DV (\%) = \frac{I - (F - F_k)}{I} \times 100$$

Onde:

I= g de nitrogênio ingerido;

F= g de nitrogênio excretado nas fezes pelo animal alimentado com a dieta em teste;

F_k= g de nitrogênio excretado nas fezes do animal alimentado com dieta aprotéica.

4.2.6.7.2 – Colesterol das fezes

Alíquotas de 50 mg de fezes foram submetidas à saponificação com 700 µL de metanol e 200 µL da solução de NaOH 5M, por duas horas em banho-maria com agitação horizontal, a 80 °C. Após a adição de solução saturada de NaCl, o colesterol foi extraído três vezes com 3 mL de éter de petróleo (TERPSTRA et al., 1998). A amostra foi seca em estufa a 40-45 °C com circulação de ar e ressuspensa em 800 µL de hexano grau CLAE. A quantificação foi realizada em equipamento de cromatografia líquida da marca Shimadzu SCL-10A – VP, com detector de varredura UV/VISÍVEL, injetor manual Rheodyne e bomba quaternária. O volume de injeção foi de 20 µL. A fase móvel compreendia uma mistura de n-hexano/isopropanol (97:3) com fluxo isocrático de 1 mL/min. O tempo de corrida foi de 5 minutos (CSALLANY et al., 1989).

4.2.6.7.3 – Ácidos Biliares

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

4.2.7 – Análise Histológica

Após sacrifício, os órgãos (fígado, baço, intestino delgado, rim e coração) foram removidos e preservados em formol tamponado 10% por pelo menos 48 horas. Em seguida foram feitas secções transversais de 2 mm no baço, intestino delgado, rim direito, coração e fígado. No coração as secções foram desde a base até o ápice.

De cada animal foram escolhidos três fatias (cortes) de cada órgão coletado e submetidos à técnicas histológicas habituais com inclusão de parafina para obtenção de cortes de 5 µm de espessura que foram corados com hematoxilina-eosina (HE) pela equipe do Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da USP.

Para estudo morfométrico foi utilizado um microscópio óptico comum (Nikon Eclipse E200) ao qual foi acoplada uma câmera fotográfica (Digital color SCC-131, Samsung).

4.2.8 – Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos em média, desvio-padrão e erro-padrão. Para a comparação de médias entre grupos, foi realizada análise de variância (ANOVA). Quando se encontrou diferença significativa foi aplicado o teste de comparação múltipla de Tukey, ao nível de significância de 5%. O programa estatístico utilizado foi SPSS 10.0 (USA). A construção dos gráficos foi realizada no programa Excel (Microsoft) e Origin[®] 7.0 SR0 (OriginLab Corporation).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da matéria prima e do isolado protéico (IP)

5.1.1- Composição Centesimal das Farinhas

Na **Tabela 4**, estão presentes os valores médios da composição química da farinha de semente de tremoço integral e descorticada e desengordurada.

Tabela 4 - Composição centesimal da farinha integral e desengordurada do tremoço (*Lupinus albus*), em base seca.

Componentes / g/100g	<i>L. albus</i>	<i>L. albus</i>
	FI [1]	FDD [2]
Umidade	5,53 ± 0,10	8,1 ± 0,30
Proteína	36,47 ± 0,2	49,88 ± 1,31
Lipídios	12,37 ± 0,19	2,94 ± 0,08
Cinzas	1,17 ± 0,03	1,54 ± 0,05
Fibra dietética		
Solúvel	0,63	3,9
Insolúvel	56,55	35,9
Fibra total	57,18	39,8

[1] Farinha integral; [2] Farinha descorticada e desengordurada

Para a produção de isolados protéicos a descorticação e o desengorduramento é necessário para se obter maior otimização na extração, além de evitar a formação de emulsões devido à presença de gordura.

De acordo com a tabela observa-se que descorticação promoveu um maior rendimento de proteína presente na farinha descorticada ($\cong 49\%$) quando comparada com o tremoço integral ($\cong 36\%$), cujos valores estão próximos ao

relatado por Martínez-Villaluenga et al. (2006), $30,6 \pm 0,26\%$ e Lqari et al. (2002), $33,8 \pm 6,9\%$.

Na farinha desengordurada o conteúdo de gordura foi de $\cong 3\%$, comparados ao valor da farinha de tremço integral usada nesse experimento ($\cong 12\%$). Valores de $14,64 \pm 1,11\%$ e $13,6 \pm 2,0\%$ de gordura para tremço integral foram relatados por Martínez-Villaluenga et al. (2006) e Lqari et al. (2002), respectivamente, estando esses valores próximos ao encontrado por Vasquez et al. (1989).

Portanto, para a farinha em estudo o processo adotado para o desengorduramento mostrou-se eficiente, contendo baixos valores de gorduras, similares a farinhas submetidas ao desengorduramento obtido por Neves et al. (2001) e Rodrigues-Ambriz et al. (2005).

Valores elevados de proteína foram relatados para amostras desengorduradas (RODRIGUES-AMBRIZ et al., 2005; NEVES et al., 2001; GARCÍA-LÓPEZ et al., 2001). Os teores de umidade e fibras obtidos para a farinha de tremço (*Lupinus albus*) estão próximos ao relatados para espécie (*L. mexicanus*) (GARCÍA-LÓPEZ et al., 2001) e (*L. angustifolius*) (LQARI et al., 2002). O valor de fibra dietética para a farinha descorticada e desengordurada foi similar ao relatado para o tremço da **Tabela 1**, entretanto o valor de fibra dietética foi maior na farinha de tremço integral usada nesse experimento.

Já o teor de cinzas encontra-se abaixo do citado na literatura (GARCÍA-LÓPEZ et al., 2001; NEVES et al., 2001; LQARI et al., 2002; RODRIGUES-AMBRIZ et al., 2005).

5.1.2- Perfil de ácidos graxos na farinha de tremço branco

O perfil de ácidos graxos obtidos para a farinha integral de tremço branco estão apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5 – perfil de ácidos graxos do tremço branco (*Lupinus albus*) expressos em porcentagens

Ácidos graxos	Tremço branco (<i>Lupinus albus</i>)	Tremço branco (<i>Lupinus albus</i>)*
Palmítico (C16:0)	10,5	11,6
Esteárico (C18:0)	2,5	1,9
Oléico (C18:1)	60,5	55,4
Linoléico (C18:2)	13	22,4
α -Linolênico (C18:3n3)	6,5	8,7
cis-eicosanóico (C20:1n9)	3,5	ni
Behênico (C22:0)	2,5	ni
Erúico (C22:1n9)	1	ni

*Erbas et al. (2005); ni= não informado

Erbas et al. (2005) relataram valores similares de ácidos graxos para o tremço branco, oriundo da Turquia, onde a prevalência aponta para o ácido graxo oléico, monoinsaturado, apresentando mais da metade do perfil lipídico. No presente trabalho esse mesmo ácido também foi prevalente no perfil de ácidos graxos totais, porém, apresentando 60% do total.

O perfil de ácidos graxos do tremço possui uma predominância de insaturados, sendo aproximadamente 64,7% monoinsaturados (C18:1; C20:1n9; C22:1n9) seguidos de 19% de poliinsaturados (C18:2; C18:3n3), a parte minoritária é representada pelos 16% de ácidos graxos saturados (C16:0; C18:0; C22:0).

O principal ácido graxo monoinsaturado presente nos alimentos é o ácido oléico, estudos apontam efeito benéfico de seu consumo reduzindo níveis de colesterol total e LDL-C, porém podendo elevar os níveis de triglicerídeos (MATTSON; GRUNDY, 1985; GRUNDY, 1986; QUILES et al., 2003).

Kurushima et al. (1995) comparando o efeito da adição de ácidos graxos poliinsaturados e monoinsaturados em dietas hipercolesterolêmicas em hamsters, relataram diminuição de colesterol total e LDL-C devido ao aumento da supressão de receptores LDL no fígado e também um aumento na atividade enzimática da 7- α hidroxilase, principalmente para o grupo monoinsaturados.

Existem duas formas de colesterol presentes nas lipoproteínas plasmáticas (colesteril-éster e livre), sendo que aproximadamente 20 a 30 % encontram-se na forma livre e são transferidos rapidamente entre as diferentes lipoproteínas. A via mais significativa para sua excreção é o sistema hepatobiliar, na forma de colesterol ou ácido biliar, este último sintetizado sob a ação da enzima 7- α hidroxilase (DANIELS et al., 2009).

O óleo do tremoço possui o ácido oléico, monoinsaturado, como predominante, apresentando mais de 60% do perfil total, estando esse valor muito próximo ao relatado para a oliva (74,2 %), em estudo realizado com dietas contendo esse tipo de óleo, revelando reduções de colesterol total e aumento de HDL-C podendo agir na prevenção de doenças cardiovasculares (QUILES et al., 2003).

5.1.3- Curva de solubilidade da farinha descorticada e desengordurada (FDD) de tremçoço

Na **Figura 5** estão demonstradas as curvas de solubilidade em água e NaCl 0,5 e 1,0 M para a farinha de tremçoço branco.

Figura 5 - Curvas de solubilidade da proteína da farinha de tremçoço em função do pH (1,0 a 12,0) e concentração de NaCl de 0,5 e 1,0 mol L⁻¹. T= 25 ± 3 °C.

A solubilidade variou conforme o pH, com maior solubilidade em extremos de pH, e na concentração de sal, com solubilidade aumentada em pH isoelétrico.

El-Adawy et al. (2001) verificaram que o aumento de solubilidade para a proteína de tremço ocorre na presença de cloreto de sódio na proporção máxima de 1M, acima desse valor foi observado uma diminuição de solubilidade. Mesmo fenômeno foi citado para a proteína majoritária (globulina) presente no tremço (NEVES et al., 2006), entretanto, nesse caso observa-se que a concentração de sal também é influenciada pelo pH.

De acordo com a **Figura 5**, observa-se uma menor solubilidade na faixa de pH 5,0, sendo essa região denominada isoelétrica, mesmo pl (ponto isoelétrico) foi verificado para tremço do Egito (El-ADAWY et al., 2001) e para a proteína majoritária do tremço (NEVES et al., 2006). A adição de NaCl acarretou na mudança do perfil de solubilidade, promovendo aumento de solubilidade na região isoelétrica.

Conforme dados expressos na curva de solubilidade, foi possível observar, na região do pl, redução de solubilidade na ausência total de sal, contrariamente observado para regiões de extremos pHs.

Com base nas curvas de solubilidade foram adotados critérios para extração dos IP. Buscando otimizar o processo, também foram adotados alguns parâmetros a partir da curva de solubilidade realizada por Neves et al. (2001) utilizando solução de NaCl 0,3M com ajustes de pH na faixa de $7,0 \leq \text{pH} \leq 10,0$. Condições de extremos de pH na presença de Na_2SO_3 , foram testadas conforme citado por Lqari et al. (2002).

5.1.4- Obtenção e otimização de produção dos isolados protéicos (IPs)

A otimização para a obtenção do IP foi seguida de acordo com os resultados da curva de solubilidade e também de acordo com a tendência de algumas literaturas (El-ADAWY et al., 2001; NEVES et al., 2001; LQARI et al., 2002; NEVES et al., 2006) para então serem analisadas e testadas o maior rendimento e pureza do mesmo.

Na **Tabela 6** encontram-se os valores médios do rendimento e conteúdo protéico para os IPs obtidos da farinha de tremço branco (*Lupinus albus*).

Tabela 6 – Rendimento e conteúdo protéico dos isolados protéicos obtidos em diferentes condições de extrações.

Isolado Protéico (IP)	pI	Rendimento (%)	Conteúdo protéico* (%)
pH 7,0 NaCl 0,3M	4,5	35,30	87,85 ± 0,53
pH 8,0 NaCl 0,3M	4,5	38,93	83,69 ± 1,11
pH 9,0 NaCl 0,3M	4,5	38,00	89,20 ± 0,94
pH 10,0 NaCl 0,3M	4,5	39,90	90,61 ± 0,62
pH 10,5 Na ₂ SO ₃ 0,25%	4,5	60,13	80,39 ± 1,19
pH 11,0 Na ₂ SO ₃ 0,25%	4,5	66,70	79,75 ± 0,37
pH 10,0 (H ₂ O)	5,0	61,05	85,82 ± 1,22
pH 11,0 (H ₂ O)	5,0	64,97	86,33 ± 1,22
pH 10,0 NaCl 0,5M**	5,0	37,63	92,41 ± 0,40
pH 11,0 NaCl 0,5M**	5,0	45,08	90,63 ± 0,63

[AOAC, 1995]; * Ultrafiltrado antes da precipitação isoelétrica (pI)

De acordo com a tabela, nota-se que o menor rendimento de extração foi verificado para pH neutro extraído com NaCl 0,3M e pI 4,5, apresentando apenas 35,3% de IP com baixo teor protéico (87,85%). Aumentando o valor de pH para 10,0 nas mesmas condições citadas acima, obteve-se um rendimento de 39,9% com aumento no teor protéico no IP para 90,61 ± 0,62%. Rodríguez-

Ambriz et al. (2005) obtiveram IP com teor protéico de $93,2 \pm 1,61\%$ utilizando extração em pH 9,0 e pl 4,5, porém seu rendimento não foi relatado.

A adição de Na_2SO_3 , promoveu o maior rendimento de extração para IP obtido em pH 11,0 (66,7%), porém com baixo conteúdo protéico ($79,75 \pm 0,37\%$). El-Adawy et al. (2001) relataram conteúdo de proteína de $91 \pm 2\%$ para IPs extraídos em pH 9,0 com bissulfito de sódio na mesma concentração. Já Lqari et al. (2002) relataram 83,9% de proteína para IP extraído em pH 10,5 com bissulfito nessa concentração, e que o valor aumenta quando realizada extração em pH 12,0 sem a presença do sal.

A **Tabela 6** também demonstrou que as condições onde houve o emprego da precipitação isoelétrica em pH 5,0, em IPs contendo NaCl 0,5M em pHs 10,0 e 11,0, seguido de diálise, pôde-se obter maior conteúdo protéico, em relação as demais condições experimentais, seguido de rendimentos intermediários.

O emprego do pl para proteínas de tremçoço pode variar entre 4,5 – 6,5, de acordo com as subunidades das proteínas (ALAMANOU; DOXASTAKIS, 1995), nesse caso o emprego do pl 5,0 foi baseado nos resultados da **Figura 5**, onde essa região de pH apresentou mínima solubilidade.

5.1.5- Perfil eletroforético da farinha e dos IPs

Diferentes condições empregadas para a obtenção dos IPs, como altos pHs, diferentes tipos de sais, podem alterar a composição da proteína presente no IP com a originária do grão integral. A fim de caracterizar a proteína

presente nas amostras foi caracterizado o perfil das amostras através de eletroforese.

A **Figura 6** apresenta o perfil eletroforético das proteínas do tremoço. Neste gel foi identificado 8 principais bandas eletroforéticas, de massa molecular entre ~15 a 70 kDa, presente em todas as amostras analisadas.

Figura 6 - SDS-PAGE das proteínas e isolados protéicos (IP) de tremoço branco. As linhas identificadas por letra e número correspondem a: **M**: padrão de peso molecular conhecido em ordem crescente; **1**: IP extraído com NaCl 0,3M em pH 7,0; **2**: IP extraído com NaCl 0,3M em pH 8,0; **3**: IP extraído com NaCl 0,3M em pH 9,0; **4**: IP extraído com NaCl 0,3M em pH 10,0; **5**: IP extraído com solução de Na₂SO₃ (0,25% de concentração) em pH 11,0; **6**: IP extraído com H₂O em pH 10,0; **7**: IP extraído com H₂O em pH 11,0; **8**: IP extraído com NaCl 0,5M em pH 11,0 (ultrafiltrado antes da precipitação isoelétrica); **9**: proteínas de farinha de tremoço branco sem alcalóides; **10**: IP extraído com NaCl 0,5M em pH 10,0 (ultrafiltrado antes da precipitação isoelétrica); **11**: proteínas da farinha de tremoço branco descorticado e desengordurado; **12**: proteínas da farinha de tremoço branco português integral.

As faixas polipeptídicas foram analisadas com software Kodak Digital Science 1D e as 8 bandas, identificadas em todas as amostras, apresentaram massa moleculares em torno de 71, 65, 51, 48, 44, 33, 19 e 14 kDa.

As condições usadas na obtenção de IP, como os diferentes pH de extração, pode contribuir para alterações e perda de frações protéicas presente no grão integral e degradação estrutural da proteína nativa. De acordo com Yu et al. (1987), esta degradação é comum em pH 2,0 onde são obtidas pequenas proporções de polipeptídios de alto peso molecular do que em pH neutro. Considerando essas perdas, a eletroforese é fundamental para verificar as diferenças, comparando com os padrões, entre as bandas presentes no grão integral e em todos os isolados obtidos pelos métodos diferentes de extração usada.

As sementes de tremçoço possuem uma aproximada relação de frações protéicas majoritárias de 1/9 de albuminas e globulinas. As globulinas incluem as frações 7S e 11S globulinas beta-conglutina (vicilina) e alfa-conglutina (legumina), e dois componentes minoritários, gama e delta-conglutina (BLAGROVE; GILLESPIE, 1975). No caso do *Lupinus albus*: **1-** Beta-conglutina é o componente da globulina majoritária formado por 10-12 tipos de subunidades majoritários (15-72kDa) e um considerável número de subunidades minoritárias sem pontes dissulfetos (MELO et al., 1994; FERREIRA et al., 2003); **2-** Alfa- conglutina é composta de quatro tipos principais de subunidades (53, 60, 66 e 70 kDa) como também várias subunidades secundárias. Na presença de agente redutor (2-mercaptoetanol), cada uma das quatro subunidades é dividida em mais cadeias polipeptídicas de alto peso molecular (31, 36, 42 e 46 kDa respectivamente) e uma cadeia polipeptidica de baixo peso molecular (19 kDa) comum nas quatro subunidades (MELO et al., 1994); e **3-** Gama-conglutina, é a globulina minoritária composta

de um tipo de subunidade (42-43 kDa) contendo duas cadeias polipeptídicas (18 e 30 kDa), ligadas por pontes dissulfetos e possivelmente outras subunidades menores (SANTOS et al., 1997).

Os padrões de migração protéica no SDS-PAGE das amostras de tremoço branco brasileiros analisados foram idênticos, apresentando 8 bandas eletroforéticas com massas moleculares na faixa de ~14 a 71 kDa. Esses resultados são similares aos obtidos por Blagrove e Gillespie (1975), Melo et al. (1994) e Neves et al. (2006), todos trabalhando com tremoço. Nenhuma diferença foi registrada entre o padrão de migração das amostras de proteínas presentes nas farinhas e nos isolados protéicos, independentemente do método de extração usado. Isto sugere que as condições experimentais utilizadas para a obtenção dos IPs não alteraram o perfil de proteína presente no grão integral. Os padrões de migração apresentado também foram semelhantes aos padrões apresentados para a amostra de tremoço integral de cultivar português.

5.1.6- Calorimetria diferencial exploratória (DSC) dos IPs

Uma vez que a eletroforese não apresentou diferenças na composição das frações protéicas, demonstrando não haver comprometimento das mesmas pelo processo de extração, empregou-se o DSC para verificar o IP que apresentasse a maior estabilidade e gasto de entalpia.

Considerando um dos objetivos do trabalho, avaliar o efeito da proteína isolada no metabolismo de colesterol, é de fundamental importância escolher a

que mais se aproxima com a proteína nativa do tremçoço, com isso essa técnica auxiliou no controle de qualidade dos IPs. A calorimetria diferencial exploratória (DSC) é uma ferramenta muito usada para verificar entre outros parâmetros, a temperatura de desnaturação e a estabilidade térmica das proteínas (FONTANARI et al., 2006; FONTANARI et al., 2008) podendo observar o grau de desnaturação da mesma.

A **Tabela 7** apresenta os valores de Entalpia ΔH (J/g) e temperatura de desnaturação (T_d) para os isolados protéicos, obtidos a partir da técnica de DSC.

Tabela 7 – Entalpia e temperatura de pico para IPs obtidos em diferentes condições de extração*.

Amostras de isolados protéicos (IP)	Entalpia ΔH (J/g)	Temperatura do pico (°C)
IP 7,0 NaCl 0,3M [†]	335,7	70,0
IP 8,0 NaCl 0,3M [†]	325,5	65,7
IP 9,0 NaCl 0,3M [†]	314,5	66,5
IP 10,0 NaCl 0,3M [†]	313,3	68,8
IP 10,5 Na ₂ SO ₃ 0,25% [†]	310,8	68,4
IP 10,0 H ₂ O ^{††}	276,9	69,3
IP 11,0 H ₂ O ^{††}	274,8	69,2
IP 10,0 NaCl 0,5 M ultrafiltrado ^{††}	277,2	69,9
IP 11,0 NaCl 0,5 M ultrafiltrado ^{††}	250,3	66,6

*massa= 3mg de proteína; $\beta=10^\circ\text{C min}^{-1}$; gás=N₂ (100mL min⁻¹); [†]pI = 4,5; ^{††}pI = 5,0.

De acordo com a **Tabela 7**, nota-se que o maior valor de entalpia, energia de ativação requerida para realizar o processo endotérmico referente à remoção de água e processo de desnaturação da proteína, é observado nas condições onde se empregou NaCl e Na₂SO₃, mostrando que a presença do sal durante a extração, modifica a estrutura da proteína e atua na sua estabilização. A estabilidade térmica de proteínas é controlada pelo balanço de

resíduos polares e apolares, com elevada estabilidade térmica (T_d) para proteínas de altas proporções de resíduos apolar (LI-CHAN; MA, 2002).

A **Tabela 7** demonstra ainda, para o IP 10,0, que com o aumento da concentração de NaCl, de 0,3M para 0,5M NaCl, ocorre a um custo menor de ΔH . Para altas concentrações de NaCl a solubilidade das proteínas são diminuídas devido ao efeito *salting-out*, podendo ocorrer precipitação e agregação de moléculas de proteínas resultante da competição entre a proteína e os íons pela água (LI-CHAN; MA, 2002).

Para os IPs extraídos na ausência de sal, pH 10 e pH 11, verificou-se que o pH influencia no valor de ΔH , sendo que para pH mais distante da neutralidade os valores de ΔH são menores, sugerindo que para pH extremos a estrutura da proteína é alterada provocando a sua desnaturação. Resultados similares foram encontrados para a globulina do arroz (ELLEPOLA; MA, 2006) e proteínas de semente de linhaça (LI-CHAN; MA, 2002), demonstrando que para IPs obtidos em pH próximos ao pl as proteínas permanecerem em seu estado nativo, conduzindo a um maior valor de ΔH , devido a ação de forças repulsivas fracas.

As **Figuras 7 (A e B)** apresentam as curvas DSC para os IPs obtidos a partir da farinha de tremço. As curvas foram realizadas no intervalo de 30-140°C e revelam a presença de um pico endotérmico, na região de 63-74°C, correspondente a temperatura de desnaturação (T_d) para os IPs.

A **Figura 7 (A)** revela que: **1-** a adição de NaCl 0,3M promoveu maiores valores de ΔH quando comparados com os IPs obtidos em apenas água, em concentrações mais baixas o sal pode provocar um efeito estabilizante

atribuído a indução eletrostática ou alteração na estrutura da água em torno da proteína promovendo a hidratação das moléculas protéicas (ELLEPOLA; MA, 2006); **2-** o IP 11,0, comparado com o IP 10,0, ambos sem sal, necessitou de menor energia de ativação (ΔH) para completar o processo endotérmico, revelando uma indução de desnaturação para pHs mais distantes da neutralidade. O mesmo comportamento foi observado para os IPs obtidos com NaCl 0,3M nos mesmos pHs.

Figura 7 – Curvas DSC para: **A)** IPs sem e com 0,3M NaCl e **B)** IPs contendo Na₂SO₃ e NaCl 0,5M ultrafiltrados.

A **Figura 7 (B)** mostra os IPs contendo NaCl 0,5M ultrafiltrados e o IP contendo Na₂SO₃ 0,25%, e de acordo com a figura e os dados da **Tabela 7**, pode se verificar que: **1-** os diferentes sais empregados tiveram efeitos distintos, sendo que o bissulfito de sódio além de aumentar a T_d apresentou maior área de pico, conseqüentemente consumindo mais ΔH para completar o

processo de desnaturação; **2-** o IP extraído em pH 10,0 apresentou maior área de entalpia ($\sim 277\Delta H$), comparado ao IP 11,0, ($\sim 250 \Delta H$), revelando haver indução no processo de desnaturação pela ação do pH.

Considerando os resultados de rendimento e conteúdo protéico obtido para os IPs (**Tabela 6**) e valores de entalpia e estabilidade térmica da proteína (**Tabela 7 e Figuras 7 A e B**), relacionados com a preservação da estrutura protéica durante o processo de extração do IP, foram usadas as condições de pH 10,0, NaCl 0,5M, seguido de diálise. Estas condições permitiram obter um IP com $8,41 \pm 0,45\%$ de umidade, $92,41 \pm 0,4\%$ de proteína, $0,18 \pm 0,04\%$ de gordura e $1,91 \pm 0,07\%$ de cinzas, em base seca.

5.1.7- Perfil de aminoácidos da farinha de tremço branco e do IP

O perfil de aminoácidos do tremço branco (*Lupinus albus*) e do isolado protéico (IP), bem como exemplo da literatura e recomendações da WHO/FAO/UNU, estão apresentados na **Tabela 8**.

De acordo com a **Tabela 8**, observa-se que os aminoácidos lisina e triptofano são limitantes no tremço integral em comparação com a recomendação da WHO/FAO/UNU para idade pré escolar (1-2 anos), na forma de IP os aminoácidos histidina, treonina, valina, além dos citados para o tremço integral, também apresentam quantidade insuficiente em relação à recomendação para idade pré escolar.

Tabela 8 – Perfil de aminoácidos do tremço branco (*Lupinus albus*) e do isolado protéico (g de aminoácido/100 g de proteína), comparados com a recomendação da WHO/FAO/UNU (2002).

Aminoácidos	Tremço branco	Tremço branco ⁽¹⁾	Isolado protéico	Recomendado WHO/FAO/UNU (2002) ⁽²⁾
Arginina	12,40	11,91	11,91	--
Cisteína	4,65	1,51	4,61	2,6*
Metionina	0,63	0,30	0,22	
Histidina	2,17	1,80	1,71	1,8
Isoleucina	4,94	4,41	4,59	3,1
Leucina	8,23	7,39	7,81	6,3
Lisina	4,30	4,09	3,00	5,2
Tirosina	4,80	5,09	5,14	
Fenilalanina	4,52	3,76	3,73	4,6**
Treonina	2,82	3,32	2,62	2,7
Triptofano	0,50	0,45	0,48	0,7
Valina	4,44	3,22	3,50	4,2
Glicina	3,87	3,46	3,39	--

(1) Tremço branco (*Lupinus albus*), (Duranti; Cerletti, 1979); (2) Recomendação para idade pré escolar;

* (Met+Cys); ** (Phe+Tyr)

O consumo de tremço seja em forma integral ou de isolado protéico, na alimentação humana, não seria fonte completa de aminoácidos recomendados, havendo a necessidade de estar suplementando com outra fonte de alimentos protéicos.

Spielman et al. (2007) relataram o tremço como tendo o triptofano como aminoácido limitante, porém outros autores também suplementaram suas dietas com lisina e metionina (CHANGO et al., 1998; MARTINS et al., 2005; BETTIZIECHE et al., 2008).

Nesse trabalho usou-se hamsters para avaliar o efeito do consumo de tremço e seu isolado protéico no metabolismo de colesterol, portanto seguiu-se uma referência própria para roedores (REEVES et al., 1993; NCR, 1995), sendo necessário suplementar os aminoácidos lisina, metionina e triptofano.

5.2 Experimento biológico

O ensaio biológico foi realizado no Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT/USP). O protocolo experimental foi seguido de acordo com trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Bioquímica e Propriedades Funcionais de Alimentos da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP).

5.2.1- Composição das dietas experimentais

A composição nutricional das dietas utilizadas no experimento biológico está apresentada na **Tabela 9**. Os valores obtidos para os parâmetros proteína, lipídios e colesterol, estão de acordo com o planejado (**Tabela 3**), apresentando-se com 20% de proteína, 20% de lipídios (máximo permitido pela NCR, 1995) e 0,1% de colesterol.

Tabela 9 – Composição das dietas utilizadas no experimento biológico, representada em g/100g de dieta, em base seca.

Ingredientes (%)	HC	IP	FI	Aprotéica
Umidade	5,10 ± 0,12	10,92 ± 0,07	9,92 ± 0,11	2,64 ± 0,15
Proteína*	21,14 ± 0,10 ^a	21,08 ± 0,20 ^a	21,31 ± 0,30 ^a	0,32 ± 0,10 ^b
Lipídios	20,13 ± 0,14 ^a	19,96 ± 0,07 ^a	19,97 ± 0,23 ^a	20,6 ± 0,17 ^a
Cinzas	2,52 ± 0,05	2,64 ± 0,04	2,65 ± 0,13	2,33 ± 0,11
Carboidratos**	51,01 ± 15,00	45,31 ± 0,10	46,05 ± 0,20	74,02 ± 0,15
Colesterol	0,10 ± 0,09 ^a	0,09 ± 0,03 ^a	0,10 ± 0,09 ^a	0,09 ± 0,03 ^a

*Fator de conversão da proteína=6,25; **Calculado pela diferença (inclui fibras); Resultados expressos em média ± desvio padrão; Letras iguais na mesma linha não representam diferença significativa (p>0,05); HC= Dieta hipercolesterolêmica controle, IP= Dieta hipercolesterolêmica com isolado protéico, FI= Dieta hipercolesterolêmica com farinha integral.

A **Tabela 9** ainda nos mostra que não houve diferença significativa, ao nível de 5%, para os parâmetros colesterol e lipídios em todas as dietas experimentais. Já para o parâmetro proteína, as dietas experimentais apresentaram diferença significativa com a dieta aprotéica, nesse caso isso já era esperado, uma vez que essa dieta tinha a finalidade de servir como alimento para o grupo da digestibilidade da proteína.

A **Tabela 10** mostra o perfil de ácidos graxos das dietas utilizadas no experimento biológico.

Tabela 10 – Perfil de ácidos graxos das dietas experimentais utilizadas no experimento biológico.

Ácido graxo	HC	IP	FI	AP
Total saturado	68,70 ± 1,00 ^a	67,9 ± 2,00 ^a	60,26 ± 1,40 ^b	67,35 ± 1,00 ^a
Total monoinsaturado	14,10 ± 0,98 ^b	14,55 ± 1,30 ^b	29,1 ± 1,10 ^a	14,6 ± 0,96 ^b
Total poliinsaturado	16,10 ± 1,10 ^a	16,97 ± 1,40 ^a	7,8 ± 2,00 ^b	17,4 ± 1,20 ^a

Resultados expressos em porcentagem; Letras iguais na mesma linha não representam diferença significativa ($p > 0,05$). HC= Dieta hipercolesterolêmica controle, IP= Dieta hipercolesterolêmica com isolado protéico, FI= Dieta hipercolesterolêmica com farinha integral.

De acordo com a **Tabela 10** observou-se diferenças significativas nos perfis de ácidos graxos das dietas experimentais HC, IP e AP em relação a dieta FI, esse fato se deu uma vez que o perfil de ácidos graxos do tremoço (**Tabela 5**) é diferente ao óleo de soja, usado nas dietas para compensar nas quantidades de óleo insaturado presente na farinha de tremoço.

Entretanto a prevalência de ácidos graxos saturados foi maior para todas as dietas em relação aos ácidos graxos insaturados.

Contudo, as dietas experimentais (HC, FI e IP) apresentaram-se com perfis de colesterol, lipídios totais e proteínas semelhantes, possibilitando que fosse avaliado o efeito da origem da proteína em cada dieta.

5.2.2 – Consumo da Dieta e dados fisiológicos dos animais

No recebimento dos animais recém desmamados (4 semanas) o peso médio foi de $84,3 \pm 7,4\text{g}$, a partir desse momento foram alojados em gaiolas individuais e submetidos a 1 semana de adaptação com ração comercial para posterior introdução da dieta hipercolesterolêmica durante 21 dias. Após esse período os animais foram divididos em 3 grupos de pesos médios iguais para iniciar o experimento com todas as dietas experimentais.

O peso inicial e final dos animais e ingestão total durante os 28 dias com dietas experimentais, ganho de peso, consumo diário médio e coeficiente de eficácia alimentar (CEA) das dietas com caseína, IP e FI estão apresentados na **Tabela 11**.

O consumo da dieta foi monitorado diariamente pela diferença entre a ração oferecida e o remanescente. O CEA foi obtido pela razão entre o ganho de peso total e o consumo da dieta durante o experimento (28 dias com dietas experimentais). De acordo com os resultados obtidos observou-se que o ganho de peso foi significativamente maior para o grupo FI, e que provavelmente se deve ao alto valor de coeficiente de eficácia alimentar (CEA) apresentado nessa ração. O peso final foi menor para o grupo IP que diferiu estatisticamente dos demais grupos.

Tabela 11 – Dados fisiológicos e peso relativo do fígado dos hamsters alimentados com diferentes dietas experimentais.

Grupo experimental	HC	IP	FI
Peso final (g)	142,8 ± 6,37 ^a	137,4 ± 3,92 ^b	145,6 ± 6,55 ^a
Ganho de peso (28 dias)	12,68 ± 4,35 ^b	11,82 ± 1,32 ^b	19,03 ± 3,18 ^a
Consumo diário (g/d)	6,62 ± 0,06	6,37 ± 0,30	6,57 ± 0,68
CEA (%) [*]	6,87 ± 2,38 ^b	6,63 ± 0,75 ^b	10,35 ± 1,60 ^a
Ingestão total da dieta (g)	185,24 ± 1,79	178,47 ± 0,86	184,2 ± 9,55
Fígado g/100 ^{**}	4,91 ± 0,21 ^a	4,46 ± 0,26 ^{ab}	4,09 ± 0,14 ^b

^{*}CEA= ganho de peso/ingestão de alimentos multiplicado por 100; ^{**}peso do fígado expresso em g/100 de peso corpóreo; Média ± erro-padrão; Letras iguais na mesma linha não representam diferença significativa ($p > 0,05$); HC= Dieta hipercolesterolêmica controle, IP= Dieta hipercolesterolêmica com isolado protéico, FI= Dieta hipercolesterolêmica com farinha integral.

Entretanto, em relação ao peso do fígado observou-se diferença significativa para o grupo FI em relação ao grupo que consumiu a ração hipercolesterolêmica HC, demonstrando que o peso corpóreo não afetou o peso do fígado.

A farinha integral de tremço adicionada na dieta enriquecida com colesterol induziu uma significativa redução no peso do fígado dos animais que consumiram a dieta contendo a caseína como fonte protéica. A média de peso do fígado do grupo FI foi menor que do grupo HC e igual ao grupo IP. O maior peso relativo do grupo HC se deve provavelmente à deposição de gordura nesses órgãos.

Frota et al. (2008) usando o mesmo protocolo experimental para testar o feijão guandu, encontrou resultados similares em relação aos pesos dos fígados, sugerindo que o colesterol é eliminado do corpo principalmente via sistema hepatobiliar ou como ácidos biliares, e uma excreção aumentada de colesterol do fígado via bile para o grupo FI, pode explicar o menor peso do órgão nesses grupos.

Outros trabalhos comparando o efeito de proteínas de leguminosas e seus isolados protéicos com a caseína, utilizando dietas hiperlipídicas e hipercolesterolêmicas, relatam o mesmo fenômeno ocorrido no presente trabalho. Macarulla et al. (2001), ao comparar o efeito do feijão e seu isolado protéico, relataram que o aumento do peso relativo do fígado ocorreu, principalmente, pelo acréscimo de colesterol total, fosfolipídios e triglicerídeos acumulados no fígado.

O isolado protéico de soja, estudado por Fukui et al. (2004), também apresentou o mesmo fenômeno que nos trabalhos referidos anteriormente. Segundo o autor a diminuição do peso pode ser um indício de que as proteínas das leguminosas apresentam efeito hipocolesterolemizante em virtude da maior excreção de esteróis ácidos e neutros, conseqüentemente ocorre um menor acúmulo desses no fígado.

Spielmann et al. (2007), também relataram menor peso de fígado para animais (ratos) que consumiram as proteínas de tremço em comparação com a caseína também atribuindo a uma diminuição de triglicerídeos presentes no fígado. A redução da concentração de triglicerídeos no fígado de ratos, em estudo utilizando proteínas de tremço, já havia sido relatada por Sirtori et al. (2004), porém, sendo atribuído a um processo de alteração de expressão de genes da enzima SREBP-1c, responsável por regular a síntese de ácidos graxos e triglicérides no fígado. Em modos gerais, os resultados relativos ao peso do fígado obtido no presente estudo corroboram com os resultados da literatura citada.

5.2.3 – Perfil Lipídico

Os marcadores plasmáticos para colesterol total, HDL colesterol, triglicerídeos e colesterol não-HDL (VLDL + LDL colesterol) foram obtidos em 4 momentos do experimento conforme procedimento descrito no item 4.2.6.5.

A **Figura 8** apresenta os resultados de colesterol total. De acordo com a figura, é possível observar que houve elevação na concentração plasmática de colesterol no período de 21 dias, após o consumo da dieta hipercolesterolemizante, sendo atingido o objetivo de hipercolesterolemização com a dieta contendo 20% caseína, 0,1% de colesterol e 13,5% de gordura de coco.

Figura 8 – Concentração de colesterol total (mg/dL) no plasma de hamsters em diferentes momentos: Basal (7 dias), após hipercolesterolemia (28 dias), após 14 dias de dieta experimental (42 dias) e final do experimento (56 dias). Valores expressos em média $\pm$ erro-padrão.

O aumento na concentração de colesterol total já foi relatado para hamsters alimentados com dietas contendo quantidade de colesterol similar a usada nesse estudo (TERPSTRA et al., 1994; CHEUNG, 1998; FROTA et al., 2008).

Após o início da intervenção dietética, a partir do dia 28, observou-se que a dieta contendo caseína (HC) teve uma tendência de continuar aumentando os níveis de colesterol, diferindo significativamente das dietas contendo o isolado protéico (IP) e a farinha de tremçoço integral (FI). Porém os resultados obtidos no tempo final do experimento para as dietas IP e FI não diferiram dos resultados obtidos no momento da hipercolesterolemia.

Esse comportamento sugere que a substituição da fonte protéica de certa forma freou a tendência de aumento do colesterol, observado para a dieta HC. Esse comportamento pode ter ocorrido devido às quantidades de gordura e proteína serem iguais (20% na composição da dieta), logo houve uma “neutralização” no aumento do colesterol. Apesar da NRC (1995) recomendar a quantidade de gordura entre 4-20%, poucos trabalhos na literatura foram encontrados com esse teor, talvez por não apresentar uma boa resposta ou ser a causa de morte de alguns animais.

Os triglicerídeos também tiveram seus valores aumentados após a introdução da dieta hipercolesterolêmica por 21 dias, e seus resultados estão apresentados na **Figura 9**.

Após 14 dias de dieta experimental (42 dias de experimento), observou-se uma diminuição de triglicerídeos para o grupo IP em relação aos demais grupos. Essa diminuição foi significativamente diferente no período final do

experimento, diminuindo, inclusive, quando comparado ao momento hipercolesterolemia (28 dias) dos animais.

Figura 9 – Concentração de triglicerídeos (mg/dL) no plasma de hamsters em diferentes momentos: Basal (7 dias), após hipercolesterolemia (28 dias), após 14 dias de dieta experimental (42 dias) e final do experimento (56 dias). Valores expressos em média $\pm$ erro-padrão.

Essa diminuição de triglicerídeos no tempo final comparado ao tempo hipercolesterolemia também foi observada por Frota et al. (2008) usando protocolo experimental similar, com o feijão caupi e sua proteína isolada como fonte protéica. Entretanto para o feijão caupi não houve diferenças significativas para os grupos experimentais no momento final do experimento.

Os valores de HDL colesterol estão apresentados na **Figura 10**.

De acordo com a **Figura 10**, os níveis de HDL colesterol foram aumentados no período de hipercolesterolemia. Esses valores foram

aumentados para os grupos IP e FI após 14 dias de intervenção sendo que no final do experimento o grupo FI diferenciou, significativamente, dos demais. Os grupos HC e IP não apresentaram diferenças significativas entre ambos, porém todos os valores no período final foram maiores quando comparados ao valor da hipercolesterolemia.

Figura 10 – Concentração de colesterol HDL (mg/dL) no plasma de hamsters em diferentes momentos: Basal (7 dias), após hipercolesterolemia (28 dias), após 14 dias de dieta experimental (42 dias) e final do experimento (56 dias). Valores expressos em média $\pm$ erro-padrão.

No presente trabalho foi observada uma redução significativa de colesterol total pelo grupo FI e IP, e consequentemente um maior valor de coeficiente da relação colesterol total/HDL-C para o grupo FI, sendo significativamente maior que os grupos IP e HC. Resultados semelhantes foram relatados por Bettzieche et al. (2008) usando extratos de tremoço, porém em ratos. Entretanto outros trabalhos realizados em hamsters usando a fração

não digerível da soja e seus extratos protéicos (GATCHALIAN-YEE et al., 1997) e o feijão caupi e sua proteína isolada (FROTA et al., 2008), relataram que o grupo que apresentou redução de colesterol total, também apresentou redução de HDL-C.

Não foram encontrados trabalhos na literatura usando tremço e seu isolado protéico em hamsters como modelo experimental, ficando sem referência para compreender os resultados encontrados.

Para o colesterol não-HDL também houve redução significativa para os grupos IP e FI, sendo mais acentuada para o grupo FI. De acordo com a **Figura 11**, observou-se que a redução é evidente após 14 dias de intervenção, sendo mais acentuada para o grupo IP.

Figura 11 – Concentração de VLDL + LDL colesterol, como colesterol não-HDL (mg/dL) no plasma de hamsters em diferentes momentos: Basal (7 dias), após hipercolesterolemia (28 dias), após 14 dias de dieta experimental (42 dias) e final do experimento (56 dias). Valores expressos em média $\pm$ erro-padrão.

A **Figura 11** também demonstrou uma tendência de diminuição do colesterol não-HDL após intervenção dietética, quando comparados com os níveis da hipercolesterolemia e do grupo HC, contrário do observado para o colesterol total, níveis finais similares ao do momento da hipercolesterolemia, apontando que além de inibir o aumento também diminuem os valores de colesterol não-HDL.

Ao término do experimento houve redução significativa de colesterol não-HDL para os grupos IP e FI em relação ao grupo controle (HC).

Os resultados do perfil lipídico dos hamsters ao final do período experimental nos diferentes grupos (HC, IP e FI), estão apresentados na

Tabela 12.

Tabela 12 – Perfil lipídico dos hamsters alimentados com diferentes dietas ricas em colesterol contendo caseína, isolado protéico de tremço e farinha integral de tremço no momento final do experimento.

Perfil lipídico	HC	IP	FI
Colesterol total	240,48 ± 6,36 ^a	203,7 ± 3,87 ^b	199,87 ± 4,37 ^b
HDL colesterol	105,81 ± 3,56 ^b	107,6 ± 4,04 ^b	123,67 ± 2,02 ^a
HDL/Colesterol total	0,48 ± 0,02 ^b	0,53 ± 0,02 ^{ab}	0,62 ± 0,02 ^a
Triglicerídeos	120,12 ± 9,88 ^{ab}	89,91 ± 3,8 ^b	146,66 ± 5,29 ^a
Colesterol não-HDL*	134,67 ± 9,02 ^a	96,11 ± 6,18 ^b	76,2 ± 4,62 ^b

*Colesterol não HDL = colesterol total – HDL colesterol; Os resultados estão expressos em mg/dL; Média ± erro-padrão; Letras iguais na mesma linha não representam diferença significativa (p>0,05); HC= Dieta hipercolesterolêmica controle, IP= Dieta hipercolesterolêmica com isolado protéico, FI= Dieta hipercolesterolêmica com farinha integral.

De acordo com a tabela 12, observou-se que a redução de colesterol total do grupo IP e FI foi de 15,3 e 16,88% respectivamente em relação ao grupo HC. Já em relação a fração colesterol não-HDL a redução foi de 28,6 e 43,41% respectivamente para os grupos IP e FI em comparação com o grupo

HC, revelando que nesse estudo houve uma melhor eficiência na redução de concentração plasmática para essa fração.

De acordo com o protocolo experimental, observou-se que os valores de colesterol total são significativamente menores para os grupos IP e FI quando comparados com o grupo HC, porém a redução é de baixa intensidade quando comparados aos níveis da fração não-HDL.

Fica evidente, principalmente para o grupo FI, que ocorre uma maior variação na distribuição das frações não-HDL e HDL-C, sendo inversamente proporcional ao grupo HC, que apresentou maiores valores para a fração não-HDL.

5.2.4 – Digestibilidade Verdadeira

Um possível mecanismo que poderia explicar a redução do colesterol nos animais alimentados com dieta contendo farinha de tremço integral e seu isolado protéico, seria a menor digestibilidade verdadeira da proteína proveniente da dieta consumida. A dieta contendo a farinha integral de tremço apresentou a maior redução de colesterol total e colesterol não-HDL, uma possível causa seria justamente a menor digestibilidade dessa proteína presente nessa dieta, provavelmente devido aos outros componentes bioativos presentes no grão integral, como saponinas, fitoesteróis e fibras (MARTINS et al., 2005).

Terpstra et al. (1994) relataram que a proteína de soja possui menor digestibilidade que a caseína e que essa fração indigerível pode atuar como

fibra complexando-se aos ácidos biliares, diminuindo sua absorção e favorecendo sua excreção.

A **Tabela 13** apresenta os valores de digestibilidade verdadeira para as dietas contendo caseína (HC), isolado protéico (IP) e farinha integral de tremoço (FI), como fonte protéica.

Tabela 13 – Digestibilidade verdadeira (%) das proteínas presente nas dietas utilizadas no experimento biológico.

Fontes protéicas	Digestibilidade verdadeira
Caseína	99,3 ± 0,3 ^a
Isolado protéico	95,3 ± 1,1 ^a
Farinha de tremoço	88,3 ± 3,3 ^b

Letras iguais na mesma coluna não representam diferença significativa; Média ± erro-padrão (p>0,05).

A digestibilidade do grupo farinha integral foi significativamente menor em relação ao grupo caseína e isolado protéico, demonstrando que a menor digestibilidade para esse grupo pode justificar o maior efeito hipocolesterolêmico.

Os resultados de digestibilidade para a caseína e isolado protéico não apresentaram diferenças significativas entre si. Resultados semelhantes foram relatado por Neves et al. (2006), quando foi avaliado a digestibilidade da fração globulina total do tremoço, e não apresentou diferenças significativas com a caseína, porém em relação a farinha foi constatado diferença significativa, apresentando apenas 86,2% de digestibilidade verdadeira, valor semelhante a esse trabalho.

No entanto a digestibilidade do isolado não diferiu da caseína, podendo sugerir que a redução de colesterol total e colesterol não-HDL causada por essa fração, não foi por esse possível efeito fibra.

O aumento da digestibilidade do isolado protéico pode ser atribuído ao processo de isolamento, onde ocorre a desnaturação de proteínas, eliminação de fatores antinutricionais e outros componentes que deixam a proteína mais disponível à ação enzimática.

Frota et al. (2008), ao analisarem a digestibilidade verdadeira do isolado protéico do de feijão caupi obteve valor de 96,8%, resultado que exclui o efeito fibra como responsável pela ação hipocolesterolemizante da proteína estudada. Resultados semelhantes foram encontrados por Mendonça et al. (2009), ao estudarem o efeito do isolado protéico de amaranto, obtendo valores de digestibilidade verdadeira de 99,8%. Esses resultados corroboram com os encontrados nesse estudo, em que a alta digestibilidade de proteína isolada do tremoço nos leva a concluir que não foi o efeito fibra da proteína o responsável pela redução nos níveis plasmáticos de colesterol total e colesterol não-HDL.

5.2.5 – Teores de Colesterol e Ácidos biliares nas Fezes

O mecanismo mais provável pelo efeito hipocolesterolêmico das leguminosas e proteínas vegetais é o aumento da excreção de ácidos biliares e aumento do fluxo de colesterol para este caminho, assim como acontece com a administração de resinas ligadoras de ácidos biliares, os quais estimulam a

síntese de ácidos biliares através da interrupção parcial do controle de retorno negativo (DUANE, 1997).

O aumento da excreção de colesterol e ácidos biliares nas fezes foram relatados para dietas contendo leguminosas integrais de alto conteúdo protéico e fibras, e com componentes bioativos, fitoesteróis e saponinas (MACARULLA et al., 2001; MARTINS et al., 2005; FROTA et al., 2008).

Esses componentes bioativos atuam no trato intestinal, geralmente considerado como mecanismo primário, complexando-se em micelas mistas de colesterol dietético e ácidos biliares (CARR et al., 2002), podendo modular a expressão dos transportadores de colesterol exógeno e ácidos biliares, ABCG5 e ABCG8 e NPC1L1, reduzindo a absorção de colesterol e a reabsorção de ácidos biliares (TURLEY; DIETSCHY, 2003; JONG et al., 2003).

Em conjunto com o aumento da síntese de ácidos biliares, o consumo de leguminosa também resulta em balanço de colesterol negativo, indicando aumento na síntese de colesterol, provavelmente para compensar o aumento de conversão em ácidos biliares (DUANE, 1997). O aumento na síntese de colesterol após o consumo de leguminosa integral pode ser confirmada através de estudo realizado por Martins et al. (2004 e 2005), que encontraram duas vezes maior a atividade de Hidroximetilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase) em porcos que receberam dieta contendo ervilha intacta comparado ao grupo que recebeu caseína e dezesseis vezes maior atividade de HMG-CoA redutase em porcos que receberam dieta contendo tremçoço integral comparado a caseína.

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

Além das leguminosas integrais, suas proteínas isoladas tem se destacado por apresentarem propriedades hipocolesterolemizantes. Estudos desenvolvidos em hamsters e ratos evidenciam que a proteína de soja aumenta a excreção fecal de ácidos biliares comparada à caseína (WRIGHT; SALTER, 1998; FUKUI et al., 2004).

Sugano (1990) e Nagaoka et al. (1999) relataram que peptídeos hidrofóbicos de alto peso molecular obtidos após hidrólise enzimática de isolado protéico de soja tem um efeito redutor de colesterol semelhante à proteína intacta. Esses peptídeos resistentes às enzimas tripsina e peptidase, conhecidos como fração não digerível, podem ter propriedade similar aquelas da fibra dietética na sua habilidade de se ligar aos ácidos biliares e colesterol, e assim, aumentar a sua excreção fecal.

Os resultados de peso das fezes secas, teores de ácidos biliares excretados nas fezes por dia e colesterol excretado nas fezes por dia, foram determinados e ajustados por 100g de peso corporal e estão apresentados na **Tabela 14**.

De acordo com a **Tabela 14** observou-se que não houve diferenças significativas entre a excreção de ácidos biliares e colesterol entre os grupos isolado e caseína, sugerindo que o isolado protéico reduziu o colesterol total e

a fração não-HDL-C plasmático por outra via, provavelmente inibindo a síntese de colesterol.

Tabela 14 – Excreção fecal de colesterol e ácidos biliares, peso das fezes dos hamsters alimentados com diferentes dietas experimentais.

Variáveis	Caseína	Isolado	Tremoço
Peso das fezes secas (g/dia)	1,13 ± 0,10	1,26 ± 0,20	1,65 ± 0,30
Ácido biliar (μmol/dia)	1,62 ± 0,30 ^b	2,5 ± 0,20 ^{ab}	4,05 ± 0,50 ^a
Ácido biliar (μmol/dia/100g de peso corporal)	1,14 ± 0,10 ^b	1,88 ± 0,20 ^{ab}	3 ± 0,90 ^a
Colesterol (μmol/dia)	2,10 ± 0,24 ^b	2,89 ± 0,10 ^b	6,42 ± 0,18 ^a
Colesterol (μmol/dia/100g de peso corporal)	1,7 ± 0,11 ^b	2,19 ± 0,08 ^b	4,79 ± 0,28 ^a

Média ± erro-padrão; Letras iguais na mesma coluna não representam diferença significativa (p>0,05)

Frota et al. (2008), ao estudarem o feijão caupi e sua proteína isolada em hamsters, também encontraram resultados similares, sugerindo que o efeito da proteína isolada na redução do colesterol sérico seja ao nível enzimático, agindo na inibição da síntese de colesterol.

Por outro lado para o grupo FI observou-se um aumento significativo de colesterol e ácidos biliares excretados nas fezes. Esses resultados também podem sugerir uma associação entre a menor digestibilidade da proteína do grupo tremoço integral e a presença de outros componentes bioativos, como as fibras, fitoesteróis e saponinas, na redução do colesterol.

Hall et al. (2005) estudaram o efeito de dietas enriquecidas com fibras de tremoço (cascas trituradas), no perfil lipídico de humanos e relataram diminuição significativa nos parâmetros colesterol total e LDL-C, sugerindo a

inibição da absorção intestinal de colesterol como mecanismo de ação. Também é atribuído ao consumo dessas fibras, a redução de riscos de câncer de cólon em homens (JOHNSON et al., 2006) devido a ação prébiotica na flora intestinal, estimulando o crescimento de colônias de bifidobactérias (SMITH et al., 2006).

Martins et al. (2005), ao estudarem o efeito do tremço integral em porcos com íleo retal anastomizados e intactos, constataram aumento significativo de colesterol fecal quando comparado ao grupo que recebeu a caseína como fonte protéica, sugerindo a ação de fibras e fitoesteróis.

5.2.6 – Análise Histológica

O acúmulo de lipídeos em tecidos que não sejam o adiposo impede o metabolismo celular normal, comprometendo a viabilidade celular. O dano induzido pelos ácidos graxos é chamado de lipotoxicidade que no fígado causa a esteatose hepática frequentemente referida como doença do fígado gorduroso não alcoólico. Esse termo engloba um espectro de doenças variando de um simples acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos a esteatose hepática com inflamação, fibrose e cirrose. O consumo de proteína de soja previne o acúmulo de triglicerídeos no fígado, reduzindo o efeito deletério da lipotoxicidade (ASCENCIO et al., 2004). O mecanismo pelo qual a proteína de soja previne esse acúmulo se dá pela redução na biossíntese de triglicerídeos e ácidos graxos, acrescido do aumento a oxidação dos últimos (TOVAR et al., 2005).

Estudos realizados por Tovar et al. (2005) investigaram se o consumo de proteína de soja comparado à caseína pode prevenir o aparecimento de anormalidades nos lipídeos hepáticos de ratos, nesse estudo foi encontrado diferença no acúmulo de lipídios hepáticos, onde menor acúmulo foi observado nos ratos que consumiam a proteína de soja. Os resultados indicam que a proteína de soja reduz a biossíntese de ácidos graxos no fígado desses animais.

Spielman et al. (2007) usando a proteína do tremçoço em ratos, também atribuíram uma redução de triglicerídeos e ácidos graxos no fígado relacionadas a redução dessa biossíntese, ligadas diretamente a SREPB-1c, que é o principal regulador de biossíntese de ácidos graxos no fígado.

A avaliação histológica do fígado incluiu a análise semi-quantitativa da presença de gordura micro e macro-vesical. Para esta análise todas as lâminas foram codificadas e analisadas por um patologista sem conhecimento prévio dos tratamentos aos quais os animais haviam sido submetidos. O grau de esteatose hepática foi graduado em uma escala de 0 até 4+, cuja classificação está demonstrada na **Tabela 15**.

Tabela 15 – Escores de esteatose hepática e respectivos significados clínicos.

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

A **Figura 12** mostra a imagem do fígado dos animais pertencentes ao grupo experimental alimentado com a dieta HC (caseína).

De acordo com a **Figura 12** observa-se que a esteatose se encontra em escore 4+ (difusa e intensa), conforme orientação das setas apontando para as deposições de glóbulos de gorduras com diferentes tamanhos dentro das células parenquimais, estando presente tanto nos hepatócitos periportais quanto nos pericentrais.

Figura 12 – Fotomicrografia de secções de 5µm de espessura do fígado coradas com HE em aumento de 400 X, ilustrando o acúmulo de gordura hepática difusa e intensa, em hamster do grupo CASEÍNA.

A **Figura 13** mostra a imagem do fígado dos animais pertencentes ao grupo experimental alimentado com a dieta IP (ISOLADO PROTÉICO).

De acordo com a **Figura 13**, observou-se que o acúmulo de gordura hepática no hamsters do grupo isolado protéico foi focal quando comparado

com o grupo caseína (difundido). Nesse caso o grau de esteatose foi 1+ (esteatose focal).

Figura 13 – Fotomicrografia de secções de 5µm de espessura do fígado coradas com HE em aumento de 400 X, ilustrando o acúmulo de gordura hepática centro lobular, em hamster do grupo ISOLADO PROTÉICO.

A **Figura 14** mostra a imagem do fígado dos animais pertencentes ao grupo experimental alimentado com a dieta FI (FARINHA INTEGRAL).

Para esse grupo o nível de esteatose foi denominado de nível 1-, apesar desse valor não aparecer na **Tabela 15**, significa que houve uma esteatose focal, porém, de menor intensidade que a esteatose apresentada para o grupo IP.

Nesse caso as setas mostram as áreas preservadas do órgão, revelando o efeito hepatoprotetor da farinha de tremçoço.

Figura 14 – Fotomicrografia de secções de 5µm de espessura do fígado coradas com HE em aumento de 400 X, ilustrando o acúmulo de gordura hepática, em hamster do grupo FARINHA INTEGRAL.

Há relatos de que o tratamento com alta concentração de colesterol pode causar danos no fígado (BOLKENT et al., 2004). Entretanto, no presente trabalho foi observado que as dietas contendo o isolado protéico e principalmente a farinha integral do tremço conseguiram inibir o avanço de esteatose, observado para o grupo caseína.

As análises histológicas do coração e arco aórtico não demonstraram formação de placas de ateroma, nem alterações no ventrículo esquerdo compatíveis de aterosclerose estabelecida. Para os demais órgãos removidos e estudados, não foram encontrados alterações sugestivas de patologia estabelecida.

6 CONCLUSÕES

Com este estudo pode-se concluir que o tremoço integral e seu isolado protéico apresentaram eficiência na redução de colesterol total e colesterol não-HDL. A proteína é o componente desse grão responsável por grande parte do efeito hipocolesterolemizante (redução de 15,3% no colesterol total e 28,6% no colesterol não-HDL observado no grupo isolado). Aparentemente há um sinergismo entre outros componentes do grão integral, como fibras, saponinas e fitoesteróis que potencializam esse efeito hipocolesterolemizante.

O isolado protéico e o tremoço integral apresentaram efeito hepatoprotetor reduzindo o acúmulo de gordura nos hepatócitos, mesmo na presença de dieta contendo elevados teores de gorduras e colesterol.

O mecanismo pelo qual o isolado protéico de tremoço proporcionou o efeito hepatoprotetor e hipocolesterolemizante ainda não está esclarecido, pois não foi observada diferença significativa na excreção de ácidos biliares e colesterol nas fezes comparado ao grupo caseína, nem na digestibilidade verdadeira.

Para o tremoço integral ficou elucidado que os efeitos benéficos deste grão estão associados à menor absorção e ou reabsorção de colesterol, excretado nas fezes, diante da menor digestibilidade da semente quando comparada a proteína de origem animal, que pode interferir juntamente com outros componentes na redução da reabsorção êntero-hepática e no aumento da excreção de ácidos biliares e colesterol nas fezes.

Conclusão

Por fim, os resultados obtidos no presente trabalho corroborando com o que já é dito na literatura, conclui-se que o tremoço possui potencial funcional e contribui para uma alimentação saudável e equilibrada, colaborando com a manutenção da qualidade de vida.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELL, L. L.; LEVY, B. B.; BRODIE, R. B.; KENDALL, R. B. Simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J. Biol. Chem.*, n. 195, 357-366, 1952.

ALAMANOU, S.; DOXASTAKIS, G. Thermoreversible size selective swelling polymers as a means of purification and concentration of lupin seed proteins (*Lupinus albus ssp. Graecus*). *Food Hydrocolloids*, v. 9, n.2, p. 103-109, 1995.

ALLEN, J. G. Toxins and lupinosis. In J. S. Gladstones, C. A. Atkins, & J. Hamblin (Eds.), *Lupines as a crop plant biology, production and utilization*. South Perth: CAB International. p. 411–428, 1998.

ANDERSON, J. W.; JOHNSTONE, B. M.; COOK-NEWELL, M. E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipid. *N. Engl. J. Med.*, v. 333, p. 276-282, 1995.

ANDERSON, J. W.; MAJOR, A. M. Pulses and lipaemia, short and long term effect: potential in prevention on cardiovascular disease. *Br. J. Nutr.*, v88, suppl. 3, p. 263-271, 2002.

ANDERSON, J. W.; STORY, L.; SIELING, B.; CHEN, W. J. L.; PETRO, M. S.; STORY, J. Hypocholesterolemic effects of oat-bran or bean intake for hypercholesterolemic men. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 40, p. 1146-1155, 1984.

ASCENCIO, C.; TORRES, N.; ISOARD-ACOSTA, F.; GÓMEZ-PÉREZ, F. J.; NERNÁNDEZ-PANDO, R.; TOVAR, A. R. Soy protein effects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. *J. Nutr.*, v. 134, p. 522-529, 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). *Official methods of analysis*. 16 ed. Arlington, 1995.

BARBOSA, J. Doenças não-transmissíveis: tema relevante para a vigilância em saúde pública no Brasil. In: III FÓRUM GLOBAL DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE DOENÇAS NÃO-TRANSMISSÍVEIS, 3., 2003, Rio de Janeiro, [Anais...]. Rio de Janeiro, 2003.

BENEYTOUT, J. L.; DESMAISON, A. M.; NAJID, A.; RIGUD, M. Composition en acides gras de dix espèces et variétés de lupin. Sci. Aliments, 7, Hors Série VIII: 337-345, 1987.

BETTZIECHE, A.; BRANDSCH, C.; SCHMIDT, M.; WEIBE, K.; EDER, K.; STANGL, G. I. Differing effect of protein isolates from different cultivars of blue lupin on plasma lipoproteins of hypercholesterolemic rats. Biosci. Biotechnol. Biochem., v. 72, n. 12, p. 3114-3121, 2008.

BEYNEN, A. C. Comparasion of the mechanisms proposed to explain the hypocholesterolemic effect of soybean protein versus casein in experimental animals. J. Nutr. Sci. Vitaminol, 36 (10S), p. 87-93, 1990.

BHATHENA, J.; MARTONI, C.; KULAMARVA, A.; URBANSKA, A. M.; MALTHOTRA, M.; PRAKASH, S. Orally Delivered Microencapsulated Live Probiotic Formulation Lowers Serum Lipids in Hypercholesterolemic Hamsters. Journal of Medicinal Food, v. 12, n. 2, p. 310-319, 2009.

BLAGROVE, R. J.; GILLESPIE, J. M. Isolation, purification and characterization of the seed globulins of *Lupinus Albus*. Aust. J. Plant. Physiol. n. 2, p. 13-27, 1975.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Biophys., v. 37, p. 911-917, 1959.

BOLKENT, S.; YANARDAG, R.; DOGER, M. M. Benefical effects of combined treatment with niacina and chromium on the liver of hyperlipidemic rats. Biol Trace Elem Res., v. 101, p. 219-230, 2004.

CARR, T. P.; CORNELISON, R. M.; ILLSTON, B. J.; STUEFER-POWELL, C. L.; GALLAHER, D. D. Plant sterols alter bile acid metabolism and reduce cholesterol absorption in hamsters fed a beef-based diet. *Nutr. Res.*, n. 22, p. 745–754, 2002.

CARROL, K. K. Review of clinical studies on cholesterol-lowering response to soy protein. *J. Am. Diet Assoc.*, 91 (7), p. 820-827, 1991.

CASTELLI, W. P.; GARRISON, R. J.; WILSON, W. F., ABBOTT, R. D.; KALOUSDIAN, S.; KANNEL, W. B. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: The Framingham study. *The Journal of the American Medical Association*, v. 256, n. 20, p. 2835-2838, 1986.

CHANGO, A.; VILLAUME, C.; BAU, H. B.; SCHWERTZ, A.; NICOLAS, J. P.; MEJEAN, L. Effects of casein, sweet white lupin and sweet yellow lupin diet on cholesterol metabolism in rats. *J. Sci. Food Agric.*, v. 76, p. 303-309, 1998.

CHEUNG, P. C. K. Plasma and hepatic cholesterol levels and fecal neutral sterol excretion are altered in hamsters fed straw mushroom diets. *J. Nutr.*, v. 128, p. 1512-1516, 1998.

CRAIG, W. J. Phytochemicals: guardians of our health. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 97, p. s199-s204, 1997.

CSALLANY, A. S.; KINDOM, S. E.; ADDIS, P. B.; LEE, J. H. HPLC method for quantification of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues. *Lipids.*, v. 24, n. 7, p. 645-651, 1989.

CULLEN, P. Evidence that tryglicerides are an independent coronary risk factor. *American Journal cardiology*, v. 86, p. 943-949, 2000.

DANIELS, T. F.; KILINGER, K. M.; MICHAL, J. J.; WRIGHT, R. W.; JIANG, Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *Int. J. Biol. Sci.*, v.5, n.5, p. 474-488, 2009.

D'AGOSTINA, A. D.; ANTONIONI, C.; RESTA, D.; ARNOLDI, A.; BEZ, J.; KNAUF, U.; WASCHE, A. Optimization of a pilot-scale process for producing lupin protein isolates with valuable technological properties and minimum thermal damage. *J. Agric. Food Chem.*, n. 54, p. 92-98, 2006.

DESPRÉS, J. P.; LEMIEUX, I.; DAGANAIS, G. R.; HDL-cholesterol as a marker of coronary heart disease risk: The Québec cardiovascular study. *Atherosclerosis*, v. 153, p. 263-272, 2000.

DIETSCHY, J. M. Theoretical considerations of what regulates low-density-lipoprotein and high-density-lipoprotein cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* 65: 1281S-1589S. 1997.

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

DUANE, W. C. Effects of legume consumption on serum cholesterol, biliary lipids, and sterol metabolism in humans. *J. Lipid Res.*, v. 38, p. 1120-1126, 1997.

DURANTI, M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, v. 77, p. 67-82, 2006.

DURANTI, M.; CERLETTI, P. Amino acid composition of seed proteins of *Lupinus albus*. *Journal of Agriculture and Food chemistry*, v. 27, n. 5, p. 977-978, 1979.

DURANTI, M.; GIUS, C. Legume seeds: protein content and nutritional value. *Field Crops Research*, v. 53, p. 31-45, 1997.

DURANTI, M.; LOVATI, M. R.; DANI, V. The alpha'-subunit from soybean 7S globulin lowers plasma lipids and upregulates liver beta-VLDL receptors in rats fed a hypercholesterolemic diet. *J. Nutr.*, v. 134, p. 1334-1339, 2004.

EL-ADAWY, T. A.; RAHMA, E. H.; EL-BEDAWAY, A. A.; GAFAR, A. F.; Nutritional potential and functional properties of sweet and bitter lupin seed protein isolates. *Food Chemistry*, v. 74, p. 455 – 462, 2001.

ELLEPOLA, S. W.; MA, C. Y. Thermal properties of globulin from rice (*Oryza sativa*) seeds. *Food Research International*, v. 39, p. 257-264, 2006.

ERBAS, M.; CERTEL, M.; USLU, M. K. Some chemical properties of White lupin seeds (*Lupinus albus* L.). *Food Chemistry*, v. 89, p. 341-345, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). FAOSTAT – Production crops world 2008. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor/>. Acesso em: 23 abr. 2010.

FERREIRA, R. B.; FREITAS, R. L.; TEIXEIRA, A. L. The structure of *Lupinus* seed storage proteins. Recent developments. *Current Topics in Plant Biology*, v. 4, p 139-150, 2003.

FIETZ, V. R.; SALGADO, J. M. Efeito da pectina e da celulose nos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos hiperlipidêmicos. *Ciênc. Tecnol. Alim.*, v. 19, n. 3, p.318-321, 1999.

FONTANARI, G. G.; BATISTUTI, J. P.; BANNACH, G.; PASTRE, I. A.; IONASHIRO, E. Y.; FERTONANI, F. L. Thermal study and physico-chemical characterization of some functional properties of guava seeds protein isolate (*Psidium guajava*). **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 83, n. 3, p. 709-713, 2006.

FONTANARI, G. G.; SOUZA, G. R.; BATISTUTI, J. P.; NEVES, V. A.; PASTRE, I. A.; FERTONANI, F. L. Differential scanning calorimetry of the protein isolate and the major protein fraction of guava seeds (*Psidium guajava*). **J. Therm. Anal. Calorim.**, v.93, n. 2, p. 397-402, 2008.

FROTA, K. M. G.; MENDONÇA, S.; SALDIVA, P. H. N.; CRUZ, R. J.; ARÊAS, J. A. G. Cholesterol-Lowering properties of whole cowpea seed and its protein isolate in hamsters. *J. Food Sci.*, v. 73, n. 9, p. 235-240, 2008.

FUKUI, K.; TACHIBANA, N.; FUKUDA, Y.; TAKAMATSU, K.; SUGANO, M. Ethanol washing does not attenuate the hypocholesterolemic potential of soy protein. *Nutrition*, v. 20, p. 984-990, 2004.

GARCÍA-LOPEZ, P. M.; MUZQUIZ, M.; RUIZ-LOPEZ, M. A.; ZAMORA-NATERA, J. F.; BURBANO, C.; PEDROSA, M. M.; CUADRADO, C.; GARZÓN-DE LA MORA, P. Chemical composition and fatty acid profile of several Mexican wild lupins. *J. Food Comp. Anal.*, v. 14, p. 645-651, 2001.

GATCHALIAN-YEE, M.; ARIMURA, Y.; OCHIAI, E.; YAMADA, K.; SUGANO, M. Soybean protein lowers serum cholesterol levels in hamsters: effect of debittered undigested fraction. *Nutrition.*, v. 13, p. 633-639, 1997.

GRUNDY, S. M. Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for lowering plasma cholesterol. *N. Engl. J. Med.*, v. 314, p. 745 – 748, 1986.

HALL, R. S.; JOHNSON, S. K.; BAXTER, A. L.; BALL, M. J. Lupin kernel fibre-enriched foods beneficially modify serum lipids in men. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 59, p. 325-333, 2005.

HALL, R.; KOK, E.; JAVITT, N. B. Bile acid synthesis: down-regulation by monohydroxy bile acids. *FASEB J.* n. 2, p. 152. 1988.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, n. 494 (22), p. 475-476, 1973.

HASLER, C. M. Functional foods: Benefits, concerns and challenges – A position paper from the American Council on Science and Health. *Journal of Nutrition*, n. 132, p. 3772-3781, 2002.

HOLM, F. New functional food ingredients. Cardiovascular Health. SMEs n. 5, Flair-flow 4, 2003.

HUYGHE, C. White lupin (*Lupinus albus* L.). Field Crops Res., n. 53, p. 147-160, 1997.

JOHNSON, S. K.; CHUA, V.; HALL, R. S.; BAXTER, A. L. Lupin kernel fibre foods improve bowel function and beneficially modify some putative faecal risk factors for colon cancer in men. British Journal of Nutrition, v. 95, p. 372-378, 2006.

JONES, P. J. Clinical Nutrition: 7. Functional foods – more than just nutrition. Canadian Medical Association Journal, v. 166, p. 1555-1563, 2002.

JONG, A.; PLAT, J.; MENSINK, R. P. Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review). J. Nutr. Biochem., v. 14, p. 362-369, 2003.

KAHLON, T. S.; WOODRUFF, C. L. In vitro binding of bile acids by soy protein, pinto beans, black beans and wheat gluten. Food Chem., n. 79, p. 425-429, 2002.

KERCKHOFFS, D. A. J. M.; BROUNS, F.; HORNSTRA, G.; MESINK, R. P. Effects on the humans serum lipoprotein profile of β -glucan, soy protein and isoflavones, plant sterols and stanols, garlic and tocotrienols. J. Nutr., n. 132, p. 2494-2505, 2002.

KIM, D. N.; LEE, K. T.; REINER, J. M.; THOMAS, W. A. Effect of a soy protein product on serum and tissue cholesterol concentrations in swine fed high-fat, high-cholesterol diets. Exp. Mol. Pathol., n. 299, p. 385–399, 1978.

KINGMAN, S. M. The influence of legume seeds on human plasma lipid concentrations. Nutr. Res. Rev. n. 4, p. 97–123, 1991.

KINGMAN, S. M.; WALKER, A. F.; LOW, A. G.; SAMBROOK, L. E.; OWEN, R. W.; COLE, T. J. Comparative effects of flour legume species on plasma lipids and faecal steroid excretion in hypercholesterolaemic pigs. *British Journal of Nutrition*, v. 69, p. 409-421, 1993.

KRITCHEVSKY, D. In vitro binding properties of dietary fibre. *Eur. J. Clin. Nutr.* N. 49, p. 113-115, 1995.

KRITCHEVSKY, D. Vegetable protein and atherosclerosis. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, n. 56, p. 135–146, 1979.

KURUSHIMA, H.; HAYASHI, K.; TOYOTA, Y.; KAMBE, M.; KAJIYAMA, G. Comparison of hypocholesterolemic effects induced by dietary linoleic acid and oleic acid in hamsters. *Atherosclerosis*, n. 114, p. 213-221, 1995.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680 - 4, 1970.

LIADAKIS, G. N.; TZIA, C.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C. D. Protein Isolation from Tomato Seed Meal, Extraction Optimization. *J. Food Sci.*, v.60, p. 477-482, 1995.

LIN, Y.; MEIJER, G. W.; VERMEER, M. A; TRAUTWEIN, E. A. Soy protein enhances the cholesterol-lowering effect of plant sterol esters in cholesterol-fed hamsters. *J. Nutr.* 134, p. 143-148, 2004.

LI-CHAN, E. C. Y.; MA, C. Y. Thermal analysis of flaxseed (*Linum usitatissimum*) proteins by differential scanning calorimetry. *Food Chemistry*, v. 77, p. 495-502, 2002.

LOCK, A.; HORNE, C. A. M.; BAUMAN, D. E.; SALTER, A. M. Butter naturally enriched in conjugated linoleic acid and vaccenic acid alters tissue fatty acids and improves the plasma lipoprotein profile cholesterol-fed hamsters. *J. Nutr.*, v. 135, p. 1934-1939, 2005.

LOOKENE, A.; ZHANG, L.; HULTIN, M.; OLIVECRONA, G. Rapid subunit exchange in dimeric lipoprotein lipase and properties of the inactive monomer. *J Biol Chem.*, n. 279, v. 48, p. 49964-49972, 2004.

LORGERIL, M.; SALEN, P. The Mediterranean-style diet for the prevention of cardiovascular diseases. *Public Health Nutr.*, v. 9, n. 1A, p. 118-123, 2006.

LOTTENBERG, A. M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. *Arq. Brás. Endocrinol. Metab.*, n.53, v. 5, p. 595-607, 2009.

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

MACARULLA, M. T.; MEDINA, C.; DE DIEGO, M. A.; CHÁVARRI, M.; ZULET, M. A.; MARTÍNEZ, J. A.; SUBERVILLE, C. N.; HIGUERET, P.; PORTILLO, M. P. Effects of the whole seed and a protein isolate of faba bean (*Vicia faba*) on the cholesterol metabolism of hypercholesterolaemic rats. *B. J. Nutr.*, n. 85, p., 607-614, 2001.

MAGNI, C.; SESSA, F.; ACCARDO, E.; VANONI, M.; MORAZZONI, P.; SCARAFONI, A.; DURANTI, M. Conglutin gamma, a lupin seed protein, binds insulin in vitro and reduces plasma glucose levels of hyperglycemic rats. *J. Nutr. Biochem.*, n. 15, p. 646-650, 2004.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. Krause: Alimentos e Dietoterapia. 9° ed. São Paulo: Roca, 1998.

MAHLEY, R. W.; HUANG, Y. Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing. *J Clin Invest.* n. 117, v. 1, p. 94-98, 2007.

MARCHESI, M.; PAROLINI, C.; DIANI, E.; RIGAMONTI, E.; CORNELLI, L.; ARNOLDI, A.; SIRTORI, C. R.; CHIESA, G. Hypolipidaemic and anti-atherosclerotic effects of lupin proteins in a rabbit model. *British J. Nutr.*, n.100, p. 707-710, 2008.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; FRÍAS, J.; VALVERDE, C. V. Functional lupin seeds (*Lupinus albus* L. and *Lupinus luteus* L.) after extraction of α -galactosides. *Food Chem.*, n. 98, p. 291-299, 2006.

MARTINS, J. M.; RIOTTO, M.; ABREU, M. C.; LANÇA, M. J.; VIEGAS-CRESPO, A. M.; ALMEIDA, J. A.; FREIRE, J. B.; BENTO, O. P. Dietary raw peã (*Pisum sativum* L.) reduce plasma total and LDL cholesterol and hepatic esterified cholesterol in intact and ileorectal anastomosed pigs fed cholesterol-rich diets. *J. Nutr.*, v. 134, p. 3305-3312, 2004.

MARTINS, J. M.; RIOTTO, M.; ABREU, M. C.; VIEGAS-CRESPO, A. M.; LANÇA, M. J.; ALMEIDA, J. A.; FREIRE, J. B.; BENTO, O. P. Cholesterol-lowering effects of dietary blue lupin (*Lupinus angustifolius* L.) in intact and ileorectal anastomosed pigs. *Journal of Lipid Research*, V. 46, p. 1539-1547, 2005.

MATHUR, K. S.; SINGHAL, S. S.; SHARMA, R. D. Effect of Bengal gram on experimentally induced high levels of cholesterol in tissues and serum in albino rats. *J. Nutr.* n. 84, p. 201–204, 1964.

MATTSON, F. H.; GRUNDY, S. M. Comparasion of effects of dietary saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids em plasma lipids lipoproteins im man. *Journal Lipid Research*, n. 26, p. 194-202, 1985.

MELO, T. S.; FERREIRA, R. B.; TEIXEIRA, A. N. The seed storage proteins from *Lupinus albus*. *Phytochemistry*, v.37, p. 641-648, 1994.

MENDONÇA, S.; SALDIVA, P. H.; CRUZ, R. J.; ARÊAS, J. A. G. Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. *Food Chem.*, v. 116, p. 738-742, 2009.

MULAYIM, M.; TAMKOC, A.; BABAOGLU, M. Sweet lupins versus local bitter genotype: agronomic characteristic as affected by different planting densities in the Goçler region of Turkey. *European Journal of Agronomy*, n. 17, p. 181–189, 2002.

MUSQUIZ, M.; BURBANO, C.; REY, C.; CASSINELLO, M. A chemical study of *Lupinus hispanicus* seed. Nutritional components. *J. Sci. Food. Agric.*, n. 47, p. 197-204, 1989.

NAGAOKA, S.; MIWA, K.; ETO, M.; KUZUYA, Y.; HORI, G.; YAMAMOTO, K. Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decrease micellar solubility and cholesterol absorption in rats and Caco-2 cells. *J. Nutr.*, v. 129, p. 1725- 1730, 1999.

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

NEVES, V. A.; LOURENÇO, E. J.; SILVA, M. A. Extração, isolamento e fracionamento da proteína de tremçoço (*Lupinus albus*) var. Multolupa. *Alim. Nutr.*, n. 12, p. 115-130, 2001.

NEVES, V. A.; SILVA, S. I.; SILVA, M. A. Isolamento da globulina majoritária, digestibilidade *in vivo* e *in vitro* das proteínas do tremçoço-doce (*Lupinus albus* L.), var. Multolupa. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 26, n. 4, p. 832-840, 2006.

OAKENFULL, D. G.; FENWICK, D. E. Adsorption of bile salts from aqueous solutions by plant fibre and cholestyramine. *Br. J. Nutr.*, n. 40, p. 299–309, 1978.

OLFERT, E. D; CROSS, B. M; MCWILLIAM, A. A. Guide to the care and use of experimental animals. Ottawa, Canada: Canadian Council on Animal Care, 1993.

PANDOLF, T.; CLYDESDALE, F. M. Dietary fiber binding of bile acid through mineral supplementation. J. Food Sci., n. 57, p. 1242-1245, 1992.

PETTERSON, D. S.; SIPSAS, S.; MACKINTOSH, J. B. The chemical composition and nutritive value of Australian pulses (2nd ed.). Canberra: Grains Research and Development Corporation, 1997.

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

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

PROSKY, L.; ASP, N. G.; SCHWEIZER, T. F.; DE VRIES, J. W.; FURDA, I. Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and products: interlaboratory study. J. Assoc. Off Anal Chem., v. 71, p. 1017-1023, 1988.

QUILES, J. L.; HUERTAS, J. R.; OCHOA, J. J.; BATTINO, M.; MATAIX, J.; MAÑAS, M. Dietary fat (virgin olive oil or sunflower oil) and physical training interactions on blood lipids in the rat. Nutrition, v. 19, n. 4, p. 363-368, 2003.

QUINTÃO, E.; NAKANDAKARE, E. R. Manual de referência em dislipidemias. Novartis, 1996.

RADER, D. J.; JAYE, M. Endothelial lipase: a new member of the triglyceride lipase gene family. Curr Opin Lipidol., v. 11, n. 2, p. 141-147, 2000.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; TAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J. Nutr., v. 123, n. 11, 1939-1951, 1993.

REYNOLDS, K.; CHIN, A.; LEES, K.A.; NGUYEN, A.; BUJNOWSKI, D.; HE, J. A meta-analysis of the effect of soy protein supplementation on serum lipids. *Am. J. Cardiol.*, v. 98, p. 633-640, 2006.

RODRÍGUEZ-AMBRIZ, S. L.; MARTÍNEZ-AYALA, A. L.; MILLÁN, F.; DÁVILA-ORTÍZ, G. Composition and Functional Properties of *Lupinus campestris* Protein Isolates¹. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 60, p. 99 – 107, 2005.

ROY, F.; BOYE, J. I.; SIMPSON, B. K. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International*, v. 43, p. 432-442, 2010.

SANTOS, C. N.; FERREIRA, R. B.; TEIXEIRA, A. R. Seed proteins of *Lupinus mutabilis*. *J. Agric. Food Chem.*, v. 45, p. 3821-3825, 1997.

SÁNCHEZ-VIOQUE, R.; CLEMENTE, A.; VIOQUE, J.; BAUTISTA, J.; MILLÁN, F. Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chem.*, v. 64, p. 237 - 243, 1999.

SATHE, S. K.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. Functional properties of Lupin Seed (*Lupinus mutabilis*) Proteins and Protein Concentrates. *J. Food Sci.*, v. 47, n. 2, p. 491 - 497, 1982.

SHUTLER, S. M.; WALKER, A. F.; LOW, A. G. The cholesterol-lowering effects of legumes. I: Effects of the major nutrients. *Hum. Nutr. Food Sci. Nutr.*, n. 41F, p. 71–86, 1987.

SIDHU, G. S.; UPSON, B.; MANILOW, M. R. Effects of soy saponins and tigogenin cellobioside on intestinal uptake of cholesterol, cholate and glucose. *Nutr. Rep. Int.*, n. 35, p. 615–623, 1987.

SIRTORI, C. R.; GALLI, C.; ANDERSON, J. W.; ARNOLDI, A. Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Focus on dietary proteins. Review. *Atherosclerosis*, v. 23, n. 1, p. 8-17, 2009.

SIRTORI, C. R.; LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; CASTIGLIONI, S.; DURANTI, M.; MAGNI, C.; MORANDI, S.; D'AGOSTINA, A. D.; ARNOLDI, A. Proteins of white lupin seed, a naturally isoflavone-poor legume, reduce cholesterolemia in rats and increase LDL-receptor activity in hepG2 cells¹. *J. Nutr.*, n. 134, p. 18-23, 2004.

SMITH, S. C.; CHOY, R.; JOHNSON, S. K.; HALL, R. S.; WILDEBOER-VELOO, A. C. M.; WELLING, G. W. Lupin kernel fiber consumption modifies fecal microbiota in healthy men as determined by rRNA gene fluorescent *in situ* hybridisation. *Eur. J. Nutr.*, v. 45, p. 335-341, 2006.

SOLOMONI, F. G. Simplified manual micro-method for determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.*, n. 17, 527-534, 1971.

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.*, v. 120, p. 977-985, 1990.

SPIELMANN, J.; SHUKLA, A.; BRANDSCH, C.; HIRCHE, F.; STANGL, G. I.; EDER, K. Dietary lupin protein lowers triglyceride concentrations in liver and plasma in rats by reducing hepatic gene expression of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Ann. Nutr. Metab.*, v. 51, p. 387-392, 2007.

STIPANUK, M. Biochemical and physiological aspects of human nutrition. W.B. Saunders: Philadelphia, 2000.

TERPSTRA, A. H. M.; LAITINEN, L.; STUCCHI, A. F.; NICOLOSI, R. J. The effect of semipurified diets containing two levels (20% and 40%) of ester casein or soybean protein isolate and concentrate on plasma lipids in hamsters. *Nutr. Res.*, v. 14, n. 6, p. 885-895, 1994.

TERPSTRA, A. H. M.; LAPRE, J. A.; VRIES, H. T.; BEYNEN, A. C. Dietary pectin with high viscosity lowers plasma cholesteryl ester transfer protein activity in hamsters. *J. Nutr.* N. 128 (11), p. 1944-1949, 1998.

THOMAS, P. R.; EARL, R. Opportunities in the Nutrition and Food Science. Institute of Medicine/National Academy of Sciences, National Academy Press, Washington, DC, 1994.

TOVAR, A. R.; TORRE-VILLALVAZO, I.; OCHOA, M.; ELÍAS, A. L.; ORTÍZ, V.; AGUILAR-SALINAS, C. A.; TORRES, N. Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats. *J. Lipid Res.*, v. 46, p. 1823-1832, 2005.

TURLEY, S. D.; DIETSCHY, J. M. Sterol absorption by the small intestine. *Curr. Opin. Lipidol.*, v. 14, p. 233-240, 2003.

VAN BARNEVELD, R. J. Understanding the nutritional chemistry of lupin (*Lupinus* sp.) seed to improve livestock production efficiency. *Nutrition Research Reviews*, n. 12, p. 1-30, 1999.

VAN DER MEER, R., VRIES, H. D., GLATZ, J. F. C. t-Butanol extraction of feces: rapid procedure for enzymatic determination of fecal bile acids. In: *Cholesterol Metabolism in health and disease studies in the Netherlands*. Wageningen: Posen and Looijen, p. 113-119, 1985.

VÁSQUEZ, M.; KNAPP, E.; GUZMÁN, E.; ZACARÍAS, I. Proteínas de lupino dulce (*Lupinus luteus*, var. *Aurea/weico*, y *Lupinus albus*, var. *Multolupa*). I. extracción y filtración por sephadex. *Archivos Latinoamericanos de nutrición*, v. 39, n. 2, p. 150-158, 1989.

VIVEROS, A.; CENTENO, C.; ARIJA, I.; BRENES, A. Cholesterol-lowering effects of dietary lupin (*Lupinus albus* var *Multolupa*) in chicken diets. *Poultry Science*, v. 86, p. 2631-2638, 2007.

WANG, D. H. W. Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 69, n. 1, p. 221-248, 2006.

WANG, J. C.; KINSELLA, J. E. Functional properties of novel proteins: Alfalfa leaf protein. **J. Food Sci.**, v. 41, p. 286 - 292, 1976.

WANG, Y. H. A.; MCINTOSH, G. H. Extrusion and boiling improve rat body weight gain and plasma cholesterol lowering ability of peas and chickpeas. *J. Nutr.*, n. 126, p. 3054–3062, 1996.

WARNICK, G. R.; WOOD, P. D. National cholesterol education program recommendations for measurement of high-density lipoprotein cholesterol: executive summary. *Clin. Chem.*, v. 41, n. 10, p. 1427-1433, 1995.

WEINGARD, K. W., DAGGY, B. P. Quantification of high-density-lipoprotein cholesterol in plasma from hamsters by differential precipitation. *Clin. Chem.*, n. 36, 575, 1990.

WHO/FAO/UNU. **Report of the joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation: Protein and amino acid requirements in human nutrition.** Technical report series, n. 935, 2002, Geneva, 276p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Prevention of coronary heart disease. Geneva, 1982. (Technical report, 678).

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

YOSHIE-STARK, Y.; BEZ, J.; WADA, Y.; WASCHE, A. Functional properties, lipoxygenase activity, and health aspects of *Lupinus albus* protein isolates. *J. Agric. Food Chem.*, n. 52, p. 7681-7689, 2004.

YU, R. S. T.; KYLE, W. S. A.; HUNG, T. V.; ZECKLER, R. Characterisation of aqueous extracts of seed proteins of *Lupinus albus* and *Lupinus angustifolius*. *J. Sci. Food Agric.*, v. 41, p. 205-218, 1987.

ANEXO 1

Protocolo CEP/FCF/CAr nº 16/2009

Interessado: Gustavo Guadagnucci Fontanari

Orientador: Prof. Dr. José Paschoal Batistuti

Projeto: Efeito do consumo de tremço branco (*Lupinus albus*) e seus isolados protéicos no metabolismo do colesterol em Hamsters

Co-Orientador: Prof. Dr. José Alfredo Gomes Arêas

Parecer nº 41/2009 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Efeito do consumo de tremço branco (*Lupinus albus*) e seus isolados protéicos no metabolismo do colesterol em Hamsters", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em janeiro de 2010.

Araraquara, 21 de agosto de 2009.

A handwritten signature in purple ink is written over the printed name of the coordinator.

Prof.ª Dr.ª AURELUCE DEMONTE
Coordenadora do CEP

ANEXO 2

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA

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, 04 de novembro de 2009.

Ilmo (a)

José Alfredo Gomes Arêas

(aos cuidados de Gustavo Guadagnucci Fontanari)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CEP-IMT 054/2009** e intitulado "Efeito do consumo de tremço branco (*Lupinus albus*) e seus isolados protéicos no metabolismo do colesterol em Hamster", **sob a sua orientação**.

Atenciosamente

Dr. Paulo Cotrim

Coordenador da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT