

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**

**EFEITO DA PROTEÍNA  $\beta$ -CONGLICININA DA SOJA  
NO METABOLISMO LIPÍDICO DE ANIMAIS SUBMETIDOS À  
DIETA HIPERCOLESTEROLÊMICA**

**EDERLAN DE SOUZA FERREIRA**

**ARARAQUARA - SP**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**

**EFEITO DA PROTEÍNA  $\beta$ -CONGLICININA DA SOJA  
NO METABOLISMO LIPÍDICO DE ANIMAIS SUBMETIDOS À  
DIETA HIPERCOLESTEROLÊMICA**

**EDERLAN DE SOUZA FERREIRA**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Alimentos e Nutrição, Área de Ciências Nutricionais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – FCFAR/UNESP, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

**Prof. Dr. VALDIR AUGUSTO NEVES  
ORIENTADOR**

**ARARAQUARA - SP  
2008**

### **Ficha Catalográfica**

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

F383e      Ferreira, Ederlan de Souza  
              Efeito da proteína  $\beta$ -conglícinina da soja no metabolismo lipídico de animais submetidos à dieta hipercolesterolêmica. / Ederlan de Souza Ferreira. – Araraquara, 2008.  
              102 f.

              Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.  
              Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição  
              Orientador: Valdir Augusto Neves

              1.  $\beta$ -conglícinina. 2. Lípides plasmáticos. 3. Hipercolesterolemia.  
              4. Nutrição experimental. I. Neves, Valdir Augusto, orient. II. Título.

**CAPES: 50700006**

**EDERLAN DE SOUZA FERREIRA**

**EFEITO DA PROTEÍNA  $\beta$ -CONGLICININA DA SOJA  
NO METABOLISMO LIPÍDICO DE ANIMAIS SUBMETIDOS À  
DIETA HIPERCOLESTEROLÊMICA**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Valdir Augusto Neves (Orientador)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Aureluce Demonte (Membro titular)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carmen Guilherme Christiano de Matos Vinagre (Membro titular)

---

Prof. Dr. Elizeu Antonio Rossi (Membro suplente)

---

Prof. Dr. Osvaldo de Freitas (Membro suplente)

Araraquara, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

***DEDICO ESTE ESTUDO,***

*A DEUS,*  
que me concedeu o Dom da vida,  
e que representa fonte inesgotável de sabedoria e perseverança.

*AOS MEUS AVÓS,*  
Mariana Costa de Souza e Donaciano Ferreira de Souza,  
que sempre me ampararam, mesmo nos momentos contrários às suas opiniões.

*AOS MEUS PAIS,*  
Antônia de Souza Ferreira e Ademar Ferreira da Silva,  
que sempre me apoiaram incondicionalmente e, o mais importante, pela lição de vida.

## **MEUS AGRADECIMENTOS,**

Ao professor e grande amigo, *Valdir Augusto Neves*, pela orientação, oportunidade, confiança, dedicação e amizade que me foram proporcionadas intra e extra profissionalmente;

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. *Aureluce Demonte*, pela colaboração e pelos incentivos durante este período especial da minha vida;

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. *Carmen Vinagre*, pela importante e valiosa contribuição no aperfeiçoamento deste estudo;

Ao *Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição*, por me receber nesta Instituição e pela oportunidade de realização desta pesquisa;

Aos *docentes* do Departamento de Alimentos e Nutrição, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, pela experiência concedida durante o curso de Mestrado;

Aos técnicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, *Adriana, Angêlica, Bete, Gilberto, Lica, Marcos, Maraiza, Roberto, Rosana, Roseli e Valéria*, pelo carinho, experiência, auxílio técnico e momentos de confraternização;

Às funcionárias da Seção de Pós-graduação, *Cláudia, Laura e Sônia*, pelo acolhimento, atenção e colaboração nos momentos que necessitei;

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, *Ana, Irani, Natalina, Max, Moacir, Rita, Sônia*, pelo carinho e auxílio técnico;

À *CAPES* e *FUNDUNESP*, pela concessão da bolsa e pelo auxílio financeiro proporcionado;

Aos meus *familiares e amigos* tão distantes, mas inexplicavelmente sempre tão presentes durante este período da minha vida;

À *Maraiza Aparecida*, amiga e “anjo da guarda” de todos aqueles que conquistam sua estima; sou um felizado;

A todos os amigos, aqui representados pela *Alessandra Ferrarezi, Arnóbio Silva, Caio Aragon, Denise Selegato, Fernando Pavan, Gustavo Fontanari, Izabella Chaves, Júlio Vinuesa, Luciane Zagalo, Michelle Boesso e Priscila Fassini*, pelo apoio, experiências, por minimizarem a saudade e a distância de minha família.



**MEU AGRADECIMENTO ESPECIAL,**

*Aqueles que me confiaram à guarda e foram fundamentais na existência deste estudo. Registro aqui meu sincero respeito e agradecimento.*

*“A vida sem ciência é uma espécie de morte”*

Sócrates.

## RESUMO

Um grande interesse tem sido reportado às proteínas vegetais, em particular as da soja, cujo consumo tem indicado alternativa promissora para prevenção da dislipidemia e aterosclerose. Este estudo investigou o efeito da proteína  $\beta$ -conglucina isolada da soja, frente à resposta de um fármaco hipolipemiante (fenofibrato), em animais submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica. Cinquenta e quatro ratos machos *Wistar* foram divididos em 6 grupos ( $n=9$ ). O grupo controle (STD) recebeu uma dieta de caseína, e os demais — hipercolesterolêmicos (HC),  $\beta$ -conglucina de 200mg/kg (HC+7S<sup>1</sup>), e 300mg/kg (HC+7S<sup>2</sup>), fenofibrato de 30mg/kg (HC+FF) e  $\beta$ -conglucina 300mg/kg associada com fenofibrato 30mg/kg (HC+7S<sup>2</sup>+FF) — receberam dieta de caseína suplementada com 1% de colesterol e 0,5% de ácido cólico. Não foram observadas, nos tratamentos, alterações no crescimento, tecido adiposo, consumo e eficiência alimentar. O fenofibrato provocou aumento do peso e da concentração de triglicérido hepático. A proteína  $\beta$ -conglucina mostrou reduzir significativamente os efeitos dislipidêmicos séricos e hepáticos provocados pela dieta hipercolesterolêmica; no entanto, não foi observada adição destes efeitos quando associada ao fenofibrato. Os resultados reportados neste estudo sugerem que esta proteína tenha importante ação na regulação do metabolismo lipídico. Tais efeitos podem estar associados a peptídeos desta proteína, muito embora os mecanismos envolvidos não permaneçam completamente esclarecidos.

*Palavras-chaves: Soja;  $\beta$ -conglucina; Fenofibrato; Dislipidemia; Ratos wistar.*

## ABSTRACT

A great interest has been reported about plant proteins, particularly those of soybean whose consumption has shown potential alternatives to dyslipidemia and atherosclerosis prevention. This study investigated the effect of  $\beta$ -conglycinin protein isolated from soybean and its response to hypolipemiant drug (fenofibrate) in animals submitted to a hipercolesterolemia diet. Fifty four male *Wistar* rats were divided into 6 groups ( $n = 9$ ). The control group (STD) had received casein diet and the others — hypercholesterolemia (HC),  $\beta$ -conglycinin of 200mg/kg (HC+7S<sup>1</sup>) and 300mg/kg (HC+7S<sup>2</sup>), fenofibrate 30mg/kg (HC+FF) and  $\beta$ -conglycinin of 300mg/kg associated to fenofibrate of 30mg/kg (HC+7S<sup>2</sup>+FF) — received casein diet supplemented with 1% of cholesterol and 0.5% of cholic acid. There was no change in growth, adipose tissue, consumption and efficiency food for all treatments. The fenofibrate showed increase in weight and hepatic triglycerides. The  $\beta$ -conglycinin protein had showed significantly reduce the effects in dyslipidemic serum and liver caused by hypercholesterolemia diet, however; it was not observed some additional effects when associated with fenofibrate. The results reported in this study suggest that the protein has an important action in the regulation of lipid metabolism. These ones may be associated with their peptides although the mechanisms involved are not already completely understood.

*Keywords: Soybean;  $\beta$ -conglycinin; Fenofibrate; Dyslipidemia; Rats Wistar.*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Estrutura química do fenofibrato.....	24
<b>Figura 2.</b>	Trímero de polipeptídeos da fração $\alpha'$ da $\beta$ conglícinina.....	35
<b>Figura 3.</b>	Fluxograma de obtenção da fração protéica globulina 7S.....	47
<b>Figura 4.</b>	Distribuição individual dos animais em gaiolas de contenção.....	51
<b>Figura 5.</b>	Administração da proteína $\beta$ -conglícinina.....	53
<b>Figura 6.</b>	Composição química da farinha de soja desengordurada.....	57
<b>Figura 7.</b>	Análise de rendimento na obtenção da $\beta$ -conglícinina.....	59
<b>Figura 8.</b>	SDS-PAGE em condições redutoras da globulina 7S e suas subunidades.....	59
<b>Figura 9.</b>	Ganho de peso dos grupos experimentais tratados e não tratados com a proteína $\beta$ -conglícinina durante 28 dias.....	61
<b>Figura 10.</b>	Comparação entre os índices hepato-somático (IHS) dos grupos experimentais.....	68
<b>Figura 11.</b>	Comparação entre os índices víscero-somático (IVS) dos grupos experimentais.....	68
<b>Figura 12.</b>	Concentração sérica de colesterol total dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias.....	70
<b>Figura 13.</b>	Concentração sérica de triglicérideo dos grupos experimentais com diferentes tratamentos.....	72

<b>Figura 14.</b> Concentração sérica da lipoproteína HDL-C dos grupos experimentais com diferentes tratamentos.....	75
<b>Figura 15.</b> Concentração sérica da fração não-HDL (VLDL-c + LDL-c) dos grupos experimentais com diferentes tratamentos.....	76
<b>Figura 16.</b> Relação entre colesterol total – HDL-C dos grupos experimentais com diferentes tratamentos.....	78
<b>Figura 17.</b> Índice aterogênico dos grupos experimentais com diferentes tratamentos.....	79
<b>Figura 18.</b> Correlação entre colesterol total e colesterol não-HDL sérico, dos grupos experimentais com diferentes tratamentos.....	80
<b>Figura 19.</b> Correlação entre colesterol total sérico e índice aterogênico, dos grupos experimentais com diferentes tratamentos.....	81
<b>Figura 20.</b> Correlação entre colesterol HDL sérico e índice aterogênico, dos grupos experimentais com diferentes tratamentos.....	82
<b>Figura 21.</b> Concentração hepática de colesterol total dos grupos experimentais com diferentes tratamentos.....	84
<b>Figura 22.</b> Concentração hepática de triglicérido dos grupos experimentais com diferentes tratamentos.....	86

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Composição química do grão, farinha integral, desengordurada e resíduo da soja.....	31
<b>Tabela 2.</b>	Composição das dietas experimentais ofertadas durante 28 dias...	50
<b>Tabela 3.</b>	Grupo de animais e os diferentes tratamentos durante os 28 dias do experimento.....	52
<b>Tabela 4.</b>	Descrição das bandas, massa molecular (MM) e pureza das subunidades do isolado protéico, glicinina e $\beta$ -conglucina.....	60
<b>Tabela 5.</b>	Peso corpóreo, ingestão, excreção fecal e eficácia alimentar (EA) dos grupos experimentais após 28 dias.....	64
<b>Tabela 6.</b>	Peso relativo dos órgãos, tecido adiposo e índices hepato (IHS), víscero (IVS)-somáticos, dos grupos experimentais após 28 dias...	67

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACAT	Acil-CoA:colesterol O-aciltransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
AIN-93	<i>American Institute of Nutrition</i>
DCV	Doenças cardiovasculares
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
HDL-C	Lipoproteína de baixa densidade – Colesterol <i>High density lipoprotein – Cholesterol</i>
Hep G2	Cultura de célula hepática humana
HMG-CoA	Enzima 3-hidroxi-3-Metilglutaril CoA redutase
IHS	Índice hepato-somático
IVS	Índice víscero-somático
LDL-C	Lipoproteína de baixa densidade – Colesterol <i>Low density lipoprotein – Cholesterol</i>
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade – oxidada
mmol/L	Milimolar por litro
µmol/g	Micromolar por grama
m/v	Relação massa-volume
NCEP	<i>Current National Cholesterol Education Program</i>
kDa	Quilo dalton
PPARs	Receptores nucleares ativados pelos proliferadores dos peroxissomos
VLDL-C	Lipoproteína de muito baixa densidade – Colesterol <i>Very low density lipoprotein – Cholesterol</i>
rpm	Rotação por minuto
“S”	Unidades Svedberg
SREBP	Proteína ligante do elemento regulatório de esterol
TG	Triacilglicerídeo
TRC	Transporte reverso do colesterol



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
2.1. OBJETIVO GERAL	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>21</b>
3.1. DISLIPIDEMIA E DROGAS HIPOLIPEMIANTES (FIBRATOS)	21
3.2. PROTEÍNA VEGETAL X BENEFÍCIOS À SAÚDE	26
3.3. A SOJA	30
3.4. PROTEÍNA DA SOJA	32
3.5. PROTEÍNA DE SOJA X METABOLISMO LIPÍDICO	36
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>45</b>
4.1. LOCAL DO EXPERIMENTO	45
4.2. MATERIAL	45
4.2.1. EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO LIPÍDICA DA FARINHA DE SOJA	45
4.2.2. EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DA PROTEÍNA B-CONGLICININA DA SOJA	46
4.3. MÉTODOS	47
4.3.1. DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA	47
4.3.2. SDS-PAGE DA PROTEÍNA GLOBULINA 7S	48
4.2.3. ENSAIO BIOLÓGICO	48
4.2.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	51
4.2.5. CRESCIMENTO PONDERAL, CONSUMO ALIMENTAR E EXCREÇÃO FECAL	53
4.2.6. EFICÁCIA ALIMENTAR (EA)	54
4.2.7. COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO	54
4.2.8. ANÁLISES BIOQUÍMICAS SÉRICAS	54
4.2.9. ANÁLISES DOS LÍPIDES HEPÁTICOS	56
4.2.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>57</b>
5.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FARINHA DE SOJA DESENGORDURADA	57

<b>5.2. ISOLAMENTO DA PROTEÍNA <math>\beta</math>-CONGLICININA</b>	<b>58</b>
<b>5.3. EXPERIMENTO IN VIVO: CRESCIMENTO PONDERAL</b>	<b>60</b>
<b>5.5. PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS E ÍNDICES HEPATO E VÍSCERO-SOMÁTICOS</b>	<b>65</b>
<b>5.6. LIPÍDIOS E LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS</b>	<b>69</b>
<b>5.7. LIPÍDIOS HEPÁTICOS</b>	<b>82</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>90</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>91</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A alimentação é um dos principais fatores determinantes da saúde humana (SIRTORI et al., 2008; SIRTORI et al., 2004; KUSHI et al., 1999; SIRTORI et al., 1998). Sempre existiu, dentro da sociedade, a preocupação em prevenir e/ou retardar o aparecimento de doenças a partir da dieta. Os alimentos de origem vegetal têm importante contribuição na nutrição humana como fonte de nutrientes, além de proporcionarem compostos químicos que apresentam efeitos benéficos à saúde (DURANTI et al., 2007; SAWASHITA, 2006; DURANTI, 2006). Estudos epidemiológicos sugerem dietas à base de vegetais e grãos como fator de prevenção de doenças cardiovasculares (DCV) (SAWASHITA, 2006; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1999).

Os grãos de leguminosas são amplamente reconhecidos como importantes fontes protéicas na alimentação humana (MAGNI et al., 2004; DOMONEY, 1999; DURANTI & GIUS, 1997). A literatura cita efeitos positivos da ingestão protéica de origem vegetal em relação à animal, em especial aqueles relacionados ao metabolismo lipídico, onde tem sido extensivamente investigada (SIRTORI et al., 2008; FUKUI et al., 2002; MADANI et al., 2000; ANDERSON et al., 1995; POTTER, 1995). Recentemente, ações “nutracêuticas”, relacionadas a frações e/ou peptídeos biologicamente ativos, vêm sendo atribuídas a proteínas de alguns grãos de leguminosas (DURANTI, 2006, AOYAMA et al., 2001; SUGANO et al., 1990).

Frutos e vegetais em geral são ricos em componentes biologicamente ativos que contribuem de alguma forma à saúde humana; nesse aspecto, tem-se dado grande destaque à soja, principalmente naqueles países onde é um importante componente da dieta. Estudos têm mostrado que o baixo risco de doenças

---

coronarianas em países Asiáticos está relacionado ao consumo da soja (SACKS et al., 2006; NAGATA et al., 1998), em especial da fração protéica (PAK et al., 2005; DURANTI et al., 2004). A proteína de soja vem sendo apontada como importante promotora da redução dos fatores de risco para desenvolvimento das DCV. (SIRTORI et al., 2007; SAWASHITA, 2006).

Estudos em humanos (HOIE et al., 2005; ROSELL et al., 2004; TONSTAD et al., 2002; CARROLL & KUROWSKA, 1995) e em animais (WILSON et al., 2007; SAWASHITA, 2006; CHEN et al., 2003; MADANI et al., 2000; IWAMI et al., 1986; NAGATA, 1982) demonstram que a ingestão da proteína de soja reduz a concentração sérica do colesterol total e do triacilglicerídeo, o que motivou o FDA (Food and Drug Administration, 1999) a recomendar a ingestão de 25g/dia de proteína isolada de soja visando à redução do risco de DCV.

Muitos estudos têm sido realizados no sentido de elucidar os efeitos benéficos e mecanismos ligados ao metabolismo de lípidos pelo consumo do isolado protéico de soja. Algumas evidências mostram-se favoráveis à ação direta da proteína e/ou peptídeos em lugar de outros componentes químicos presentes na proteína de soja (SACKS et al., 2006). A remoção das isoflavonas do isolado protéico não reduziu os efeitos na concentração sérica do colesterol, lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e triacilglicerídeo em estudos com animais (DURANTI et al., 2004; FUKUI et al., 2002; AOYAMA et al., 2001) e em humanos (LICHTENSTEIN et al., 2002; JENKINS et al., 2002). Recentemente, vem sendo discutida uma proposta que relaciona a presença de peptídeos formados durante a digestão protéica, os quais estariam envolvidos na regulação do metabolismo lipídico (PAK et al., 2005; DURANTI et al., 2004; MORIYAMA et al., 2004; MANZONI et al., 2003; GREAVES et al., 2000; LOVATI et al., 2000; SIRTORI et al., 1995).

O isolado protéico de soja constitui-se predominantemente da fração globulínica, que representa entre 75-85% do conteúdo protéico total da semente. As frações glicinina (11S) e  $\beta$ -conglícinina (7S) correspondem a 31-44% e 37-39%, respectivamente, da proteína total (BROOKS, 1984). Vários estudos *in vitro* (Pak et al., 2005; MANZONI et al., 2003; LOVATI et al., 2000; LOVATI et al., 1996; SIRTORI et al., 1995; LOVATI et al., 1992; LOVATI et al., 1991; LOVATI et al., 1987) e *in vivo* (DURANTI et al., 2004; MORIYAMA et al., 2004) indicam que estas frações apresentam efeitos benéficos em diversas alterações metabólicas, em especial no metabolismo do colesterol, das lipoproteínas plasmáticas e da glicose.

Embora os estudos realizados indiquem efeitos fisiológicos benéficos a partir do consumo da proteína de soja, *in vitro* e *in vivo*, os determinantes e mecanismos envolvidos encontram-se distante de uma compreensão definitiva que relacione a ingestão da proteína com a regulação do metabolismo lipídico (DURANTI et al., 2007; ADAMS et al., 2002; LOVATI et al., 2000). Neste sentido, este estudo avaliou o efeito da administração da fração  $\beta$ -conglícinina, isolada da soja, no metabolismo lipídico e das lipoproteínas séricas em ratos alimentados com dieta indutora de hipercolesterolemia.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da administração da proteína  $\beta$ -conglucina, isolada da soja, no perfil lipídico de ratos alimentados com uma dieta hipercolesterolêmica.

### 2.2. Objetivos Específicos

Isolar, quantificar e caracterizar eletroforicamente as subunidades protéicas que formam a  $\beta$ -conglucina (7S) e glicina (11S) da soja;

Verificar os efeitos da administração da  $\beta$ -conglucina nos níveis plasmáticos de colesterol total, triacilglicerídeo e das lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) e fração não-HDL-C (VLDL-C + LDL-C) em ratos submetidos a diferentes tratamentos experimentais;

Verificar os efeitos da administração da  $\beta$ -conglucina nos níveis hepáticos de colesterol total e triglicerídeo;

Comparar os efeitos da administração da  $\beta$ -conglucina em relação aos efeitos do medicamento fenofibrato nos níveis de colesterol total e triglicerídeos plasmático e hepático;

Avaliar o efeito da administração simultânea da  $\beta$ -conglucina e do fenofibrato nos níveis plasmáticos de colesterol total, triglicerídeos e das frações lipoprotéicas HDL-C e não-HDL-C.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Dislipidemia e drogas hipolipemiantes (Fibratos)

O termo dislipidemia, quadro clínico caracterizado por concentrações anormais de lipídios e/ou lipoproteínas no sangue, ocorre por consequência multifatorial ligado a interações entre fatores genéticos e ambientais (YAMADA et al., 2007). Na literatura, sua participação como fator determinante para o DCV encontra-se bastante elucidada a partir de evidências epidemiológicas, clínicas, genéticas e estudos em animais (YAMADA et al., 2007; HORN et al., 2008). É considerada a principal causa de morte na civilização ocidental (SANTOS et al., 2001). Nos Estados Unidos, estas doenças responderam por 38,5% de todas as mortes em 2001. No Brasil, constituem a principal causa de morbimortalidade. Os indicadores brasileiros revelam que as doenças cardiovasculares excedem outras causas de óbito e, em 1998, foram responsáveis por 27% das mortes (GRILLO et al., 2005). O ônus econômico das DCV tem crescido exponencialmente nas últimas décadas. No ano de 2000, foram responsáveis pela principal alocação de recursos públicos, com aproximadamente 821 milhões de dólares. Entre 1991 e 2000, os custos hospitalares atribuídos às DCV aumentaram 176% (SANTOS et al. 2001).

Nos últimos anos, tem-se observado um aumento da prevalência da dislipidemia na população geral, caracterizada por altos níveis de LDL-C e baixos níveis de HDL-C (NCEP III, 2002; JENKINS et al., 2003). As mudanças no estilo de vida que levam ao aumento do sedentarismo e hábitos alimentares caracterizados por dietas hipercalóricas, com conseqüente sobrepeso e obesidade, tornam-se fatores que favorecem a ascendência desta prevalência (MC-NAMARA, 2000). Os níveis altos de triacilglicerídeo, por sua vez, teriam papel indireto neste processo por

determinar partículas de LDL-C pequenas e densas que seriam mais aterogênicas, resultado da sobreprodução e/ou subutilização desta fração (JENKINS et al., 2003; LAFOREST et al., 2008).

Ross (1999) faz referência a este quadro como fator de risco para a formação de ateroma, causa inicial do desenvolvimento da aterosclerose, que consiste num processo multifatorial patológico. Iniciando-se geralmente na infância, pela presença de estrias gordurosas, e que reporta manifestações clínicas na idade adulta média e/ou tardia. Estes eventos ocorrem no endotélio vascular, a partir da sinalização de citocinas, para moléculas de adesão propagarem os eventos vasculares (KRITCHEVSKY, 2002; KINLAY et al., 2001). A oxidação da LDL é considerada o principal evento de iniciação do desenvolvimento da aterosclerose (CHISOLM, & STEINBERG, 2000; JIALAL & DEVARA, 1996). A LDL-oxidada (LDL-ox) age como fator quimiotático para monócitos que, transformados em macrófagos túrgidos com lipídios (células espumosas), exercem efeitos citotóxicos sobre as células endoteliais, aumentando a ativação de plaquetas, estimulando a migração e a proliferação de células musculares lisas e antagonizando os efeitos vasodilatadores do óxido nítrico (LIMA & COUTO, 2006; CHISOLM & STEINBERG, 2000). A redução do HDL-C circulante apresenta relevância para este evento (ASSMANN & NOFER, 2003). Além disso, este episódio está diretamente acompanhado do acréscimo do colesterol de lipoproteínas aterogênicas VLDL-C e LDL-C.

Por outro lado, estudos clínicos e epidemiológicos têm relacionado fortemente o aumento da concentração da HDL-C como fator protetor no desenvolvimento das doenças coronarianas (LIMA & COUTO, 2006; YOUNG et al., 2004). O efeito antiaterogênico desta lipoproteína se dá, sobretudo, devido à sua



propriedade de transportar lípidos, principalmente ésteres de colesterol, dos tecidos periféricos para o fígado, o que é conhecido como transporte reverso do colesterol (FREDENRICH & BAYER, 2003; VON ECKARDSTEIN, et al., 2001). Outras ações protetoras importantes têm sido descritas em diversos modelos experimentais e estudos epidemiológicos (LIMA & COUTO, 2006), que incluem: proteção antioxidante (FREDENRICH & BAYER, 2003; KONTUSH et al., 2003; MACKNESS et al., 2000), mediação do efluxo de colesterol, inibição da expressão de moléculas de adesão celular, ativação de leucócitos (CYBULSKY et al., 2001; COCKERILL et al., 1999), indução da produção de óxido nítrico (ANDERSON, 2003; CANNON, 1998), regulação da coagulação sangüínea e da atividade plaquetária (NOFER et al., 2002; NOFER et al., 1998; RIDDELL et al., 1997).

No tratamento medicamentoso das dislipidemias empregam-se, freqüentemente, drogas derivadas do ácido fíbrico. Os fibratos, como são conhecidos usualmente, pertencem a uma classe de drogas hipolipemiantes, entre os quais o bezafibrato, etofibrato, ciprofibrato, clofibrato e o gemfibrozil, e que são utilizados rotineiramente na clínica (ANONYMOUS, 2001). Já há algum tempo foi desenvolvido o fenofibrato (2-[4-(4-clorobenzoil)fenoxil]-2-metilpropionato), considerado a terceira geração dos derivados do ácido fíbrico (Figura 1). Este medicamento apresenta ação hipolipidêmica mais efetiva que seus antecessores, a partir da modificação da estrutura química original, produzindo o princípio ativo fenoximetilpropionico (YAMAMOTO et al., 1996).

O mecanismo de ação dos fibratos, particularmente do fenofibrato, apresenta-se bem descrito na literatura. Os efeitos no metabolismo dos lípidos ocorrem devido à inibição hepática na síntese de ácidos graxos, intensificação do catabolismo dos triglicerídeos dos quilomicrons e de VLDL, aumento da atividade da

lipoproteína lípase nos tecidos periféricos (YAMAMOTO et al., 1996), combinado com um processo complexo que envolve a expressão coordenada de numerosos genes, cuja expressão pode ser regulada através de fatores de transcrição ativado por ligantes, denominados receptores nucleares ativado pelos proliferadores dos peroxissomos (PPARs). Estes receptores foram identificados quando uma das isoformas (PPAR $\alpha$ ) foi mostrada ser receptora de xenobióticos capazes de induzir a proliferação de peroxissomos em fígado de roedores. Posteriormente, dois outros genes de PPARs, PPAR $\beta$  e PPAR $\gamma$ 1/ $\gamma$ 2 foram descritos (CHINETTI, et al., 2001).

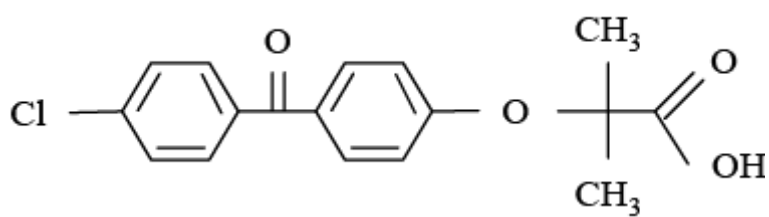


Figura 1. Estrutura química do fenofibrato

Estudos iniciais *in vivo* sobre a propriedade terapêutica e o mecanismo de ação do fibrato reportaram que este grupo hipolipidêmico agiria com eficácia na inibição da atividade da enzima 3-hidroxi-3-Metilglutaril CoA redutase (HMG-CoA) e da colesterogênese no fígado (BALFOUR et al., 1990; VESSBY et al., 1990). Entretanto, não foi observada variação na atividade desta enzima em microsossomos de fígado *in vitro*, quando tratadas com fenofibrato (BALFOUR et al., 1990; PASCAL et al. 1987), permitindo sugerir que o efeito dos derivados do ácido fíbrico na colesterogênese seria secundário nas alterações ocorridas no metabolismo lipídico. Por outro lado, a redução plasmática do colesterol total estaria atribuída diretamente ao aumento da remoção da partícula de LDL, devido ao acréscimo dos receptores e inibição da síntese de colesterol no fígado (YAMAMOTO et al., 1996).

Sirtori (2007) reporta a capacidade farmacológica dos fibratos no metabolismo da HDL. Staels et al., (1998) descreveram que a indução da lipólise das lipoproteínas, ácidos graxos hepáticos, aumento do catabolismo da partícula de LDL, da estimulação da produção e do transporte reverso da HDL, são os importantes efeitos da ação dos fibratos, reportados a partir de estudos em animais e humanos. O mecanismo de ativação desta lipoproteína está ligada ao sistema dos PPARs, sendo os fibratos os agonistas deste processo, agindo nas três classes  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . O PPAR $\alpha$  é expresso, principalmente, em tecidos que apresentam altas taxas de oxidação de ácidos graxos, como fígado, músculo esquelético, tecido adiposo marrom, coração e rim (STAELS et al., 1998; KERSTEN, 2002). O fenofibrato é ligante sintético potente e possui ação direta na regulação destes receptores nucleares ativados pelos proliferadores de peroxissomos, que desempenham papel importante no fígado, controlando o metabolismo lipídico e das lipoproteínas, por ser considerado um ativador potente da oxidação dos ácidos graxos no hepatócito (REDDY, 2001). Além disso, participam ativamente no sistema cardiovascular, nas células endoteliais e do músculo liso cardíaco. Evidências sugerem, ainda, que os PPAR $\alpha$  possam reduzir a progressão da lesão aterosclerótica por ação direta anti-aterogênica e anti-inflamatória (KERSTEN et al., 2000).

Os efeitos hipolipidêmicos têm sido bastante reportados no tratamento com fenofibrato. Pourbaix et al., (1984) e Nagayama et al., (1995) reportaram a ação do fenofibrato na atividade peroxissomal, promovendo aumento da oxidação dos ácidos graxos no fígado, redução da síntese e secreção das lipoproteínas ricas em triglicerídeos. Srivastava et al., (2006) demonstraram que o fenofibrato é capaz de prevenir a hipertrigliceridemia em camundongos com deficiência do receptor da LDL. Ferreira et al. (2006) observaram, em ratos *Wistar* tratados com fenofibrato, a

redução do ganho de peso corporal, bem como a deposição do tecido adiposo; porém, este efeito não foi relacionado à alteração na ingesta alimentar, e nem às variações na concentração plasmática de leptina. Foi observado, ainda, redução das concentrações séricas de triglicerídeos e colesterol total. Entretanto, a massa hepática dos animais tratados com fenofibrato foi significativamente maior comparada ao grupo não tratado com medicamento, como consequência do acúmulo de gordura no fígado, resultante, pelo menos em parte, da incapacidade desse órgão em secretar as VLDL e de apresentar uma menor oxidação de ácido graxo.

Sotomayor et al. (2007) mostraram, em ratos *Wistar* tratados com fenofibrato (100mg/kg/dia) por 8 semanas, redução significativa no peso corpóreo dos animais, não havendo alterações no consumo alimentar. A dose administrada promoveu a redução sérica de 51,9%, 60,9% e 45,8%, respectivamente para colesterol total, LDL-C e triacilglicerídeo. Yamamoto et al. (1996) reportaram alteração no metabolismo hepático ocasionado pela oxidação dos ácidos graxos livres e esterificados, nos hepatócitos, em parte determinado pela redução da concentração plasmática do triacilglicerídeo para ratos com dieta suplementada 0,05% de fenofibrato.

### **3.2. Proteína vegetal x benefícios à saúde**

A alimentação é um dos principais fatores determinantes da saúde humana (SIRTORI et al., 2008; SIRTORI et al., 2004; KUSHI et al., 1999; SIRTORI et al., 1998). De acordo com Mazur et al., (1998), os fatores dietéticos são extremamente importantes e devem sempre ser considerados ao se determinarem os riscos de algumas doenças. Estudos têm sido reportados há algum tempo, demonstrando que a substituição da fonte protéica de origem animal pela vegetal traz diversos

benefícios à saúde, entre estes, a homeostase nas concentrações séricas dos lípidos (CARROLL, 1992; LEFEVRE et al., 1984; GIBNEY et al., 1983). A dieta é reconhecida também como importante fator quando se deseja fazer a prevenção de doenças cardiovasculares, outras doenças crônicas não transmissíveis e alguns tipos de câncer (LAMPE, 1999).

A III diretriz brasileira sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia sugere que uma alimentação rica em frutas e vegetais, em especial com presença de grãos, fornece doses apropriadas de substâncias antioxidantes e fibras, que diminuiriam riscos do desenvolvimento da doença aterosclerótica (SANTOS et al., 2001). Estes alimentos contêm quantidades significativas de bioativos que podem fornecer desejáveis benefícios à saúde. Possivelmente, as ações sinérgicas de compostos biologicamente ativos são responsáveis diretos pelos efeitos mencionados, alcançados por meio da condição dietética adequada (LIU et al., 2003).

O NCEP (Current National Cholesterol Education Program, 2002) reporta que a redução da ingestão de gordura e colesterol pode reduzir a LDL-C em até 18%. Entretanto, outras modificações podem ser realizadas, tais como o aumento da ingestão de fibras dietéticas (JENKINS et al., 1993), e o consumo de proteínas de grãos (ANDERSON et al., 1995) e de fitoesteróides (MIETFINEN et al., 1995), que podem reduzir, em ação individual, o colesterol plasmático de 5% a 10% adicional. Os grãos são importantes componentes da dieta humana, como demonstrado pela recomendação da Food Guide Pyramid and US Dietary Guidelines (National Research Council, 1989). Eles compõem a base da pirâmide alimentar como parte de uma dieta saudável e promoção de benefícios à saúde (USDA, 2005).

Estudos epidemiológicos mostram que o consumo regular de grãos está associado à redução de risco de várias doenças crônicas, como as cardiovasculares, diabetes tipo 2, e alguns cânceres (LIU et al., 2007; LIU et al., 2003). O Dietary Guidelines for Americans and Healthy People, de 2005, recomendou o consumo diário de pelo menos três porções de grãos. No entanto, a ingestão média de grãos inteiros nos EUA é inferior a uma porção por dia, e 90% dos americanos não atendem a esta recomendação de ingestão (USDA, 2005). Deste grupo de alimento, destacam-se as sementes de leguminosas, que, por serem consideradas boas fontes de proteína, calorias, minerais e certas vitaminas, desempenham papel importante na alimentação humana, especialmente em países pobres de diferentes regiões, como os afro-asiáticos e outros em desenvolvimento (IQBAL et al., 2006; DESHPANDE, 1992).

A família das leguminosas é constituída de aproximadamente 16 a 19000 espécies; no entanto, cerca de apenas 20 são utilizadas na alimentação humana, fato este que decorre de aspectos culturais e econômicos (IQBAL et al., 2006). As proteínas são consideradas elementos essenciais da dieta para sobrevivência dos animais e humanos, e sua funcionalidade adequada no organismo torna-se dependente da ingestão apropriada em quantidade e qualidade dos aminoácidos. No entanto, a qualidade nutricional da proteína depende dos fatores ligados à própria ingestão, digestão, absorção e biodisponibilidade dos aminoácidos (DURANTI et al., 2007; DURANTI & GIUS, 1997). As proteínas deficientes em um ou mais aminoácidos são consideradas de baixa qualidade nutricional, o que caracteriza boa parte das sementes de leguminosas que possuem elevado conteúdo protéico. Porém, suas proteínas majoritárias mostram limitações para aminoácidos sulfurados e, no entanto, apresenta quantidades adequadas de lisina, deficiente nos cereais

(FARZANA & KHALIL, 1999). Além disso, essas sementes apresentam fatores antinutricionais, como os inibidores de enzimas digestivas e lectinas, que interferem na digestibilidade e qualidade nutricional da proteína (FRIEDMAN & BRANDON 2001).

Por outro lado, vários estudos têm evidenciado efeitos positivos relacionados ao consumo de proteínas de origem vegetal (SIRTORI et al., 2008; DURANTI et al., 2007; SIRTORI et al., 2007; SAWASHITA, 2006; DURANTI, 2006; DABAI et al., 1996; KINGMAN et al., 1993; GIBNEY et al., 1983). Sautier et al., (1986) reportaram que, em estudo com cinco grupos de ratos, aqueles alimentados com proteína isolada da alfafa, fava, glúten, ervilha e soja apresentaram menores concentrações de LDL-C e colesterol total séricos que os que receberam fonte protéica de origem animal, caseína, lactalbumina e ovalbumina. Mokady e Liener (1982) também demonstraram que ratos alimentados com fontes protéicas à base de soja apresentaram concentrações significativamente menores dos lipídios sanguíneos comparados ao grupo caseína.

A soja e seus derivados protéicos têm sido extensivamente abordados em estudos como potenciais na prevenção e terapêutica de doenças crônicas, principalmente as cardiovasculares e o controle da homeostase lipídica (SAWASHITA, 2006; SACKS et al., 2006; ANDRESON et al., 1995; SIRTORI et al., 1995; LOVATI et al., 1987). Além das propriedades nutricionais da proteína devido à composição química que confere a esta leguminosa um notável valor nutritivo, em virtude principalmente do expressivo percentual protéico, os efeitos benéficos associados ao seu consumo têm mostrado redução na concentração de lipídios séricos reportados em estudos com animais (SIRTORI et al., 2008; DURANTI et al., 2004; MORIYAMA et al., 2004; CHEN et al. 2003; FUKUI, et al. 2002) e humanos

(SIRTORI et al., 2007; REYNOLDS et al., 2006; ROSELL et al., 2004; TONSTAD et al., 2002; HUFF, et al., 1977).

### 3.3. A soja

A origem e o cultivo da soja (*Glycine max*, L) iniciaram-se na China, em meados do primeiro milênio, de onde se espalhou para a Ásia e passou a ser utilizada como alimento. Historicamente, foi introduzida nas colônias americanas por volta de 1765, por Samuel Bowen (HYMOWITZ & HARLAN, 1983). No Brasil, o grão chegou com os primeiros imigrantes japoneses, em 1908, mas foi inserido oficialmente no Rio Grande do Sul apenas em 1914. Porém, a real expansão da soja no Brasil ocorreu nos anos 70, com o interesse crescente da indústria de óleo e demanda do mercado internacional (SGARBIERI, 1996). A soja é uma das mais importantes oleaginosas cultivadas no mundo. Seu elevado teor protéico confere a esta leguminosa excelente fonte deste nutriente na alimentação animal e humana. O grão de soja é cultivado em regiões de clima temperado, subtropical e tropical, inicialmente para obtenção de óleo e proteína, hoje considerada a maior fonte de proteína vegetal (DURANTI et al., 2007; SGARBIERI, 1996). Seus produtos e subprodutos oferecem grande diversidade de uso para a indústria alimentícia (FARZANA & KHALIL, 1999; DURANTI & GIUS, 1997).

A composição do grão varia de acordo com condições de plantio e solo. Pode-se obter, do grão, entre 35 e 45% de proteína, 18 a 25% de lipídios, aproximadamente 30 a 34% de carboidrato e 5% de minerais (SGARBIERI, 1996; HYMOWITZ & HARLAN, 1983). Dentre os minerais, destacam-se: o potássio (1900mg), cálcio (230mg), magnésio (220mg), fósforo (580mg), ferro (9,4mg) e cobre (0,1mg), por 100 gramas de grão (TOOLE, 1999).



No processo produtivo de derivados protéicos de soja (Tabela 1), após a remoção do óleo, obtém-se a farinha desengordurada, que pode ser utilizada diretamente como ingrediente, bem como matéria-prima no beneficiamento dos derivados (HYMOWITZ & HARLAN, 1983, WOLF, 1970). A soja e derivados têm recebido atenção dos estudos, devido não apenas à quantidade, mas à qualidade da proteína, considerada, dentre os vegetais, o melhor substituto de produtos de origem animal (CARROLL, 1992; KRITCHVSKY, 1979).

Tabela 1. Composição química do grão, farinha integral, desengordurada e resíduo da soja\*

	<b>Proteína</b>	<b>Carboidrato</b>	<b>Lipídio</b>	<b>Cinza</b>
Grão de soja	38,0	23	24,5	2,88
Farinha integral	39,5	29,6	23,3	4,98
Farinha desengordurada	50,4	36,5	--	6,18
Resíduo	26,8	53,9	12,3	4,54

\*Adaptado de Kwok et al., 1997.

A utilização da soja na alimentação no Brasil é considerada limitada. Este fato está ligado principalmente por questões culturais e pelo consumo não habitual, embora o país tenha uma extensa produção do grão. Estudos realizados nos últimos anos têm evidenciado determinadas propriedades terapêuticas da proteína de soja, tais como, anticancerígena, redutora na taxa dos lipídios séricos, controle do sobrepeso, obesidade, diabetes, nos efeitos da menopausa e prevenção das doenças cardiovasculares (REYNOLDS et al., 2006; IQBAL et al., 2006; SACKS et al., 2006; HOIE et al., 2005; FRIEDMAN & BRANDON, 2001). Deste modo, permanece uma tendência mundial, inclusive no Brasil, no aumento do consumo

devido aos benefícios à saúde, que vêm sendo atribuídos à proteína de soja e seus derivados protéicos (SGARBIERI, 1996).

### **3.4. Proteína da soja**

A proteína da soja é usada na alimentação humana em uma diversidade de produtos e preparações, que incluem fórmulas infantis, farinhas, proteína isolada, concentrada e texturizada, adicionada em alimentos como queijos, bebidas, temperos, tofu, salame e substitutos de carne vegetariana (LIU, 2000; SINGH et al., 2000).

A grande parte da proteína encontra-se em corpúsculos contidos nas células cotiledonares. Os pesos moleculares das proteínas da soja variam de 8.000 a 600.000 Daltons, com maior concentração na faixa de 110.000 a 350.000 Daltons. Na soja, a separação das proteínas por ultracentrifugação apresenta frações cujos coeficientes de sedimentação são 2S, 7S, 11 e 15S (CHEFTEL et al., 1989; WOLF, 1970; LIU, 1997). Os primeiros estudos de caracterização de proteínas de reserva foram realizados com o grão de ervilha que mostraram dois grupos principais com os coeficientes de sedimentação de 7 e 11 "S" (unidades Svedberg, a 20 °C em água), sendo nomeados, respectivamente, de vicilina e legumina. Posteriormente, em termos gerais, as proteínas correspondentes de outras leguminosas são frequentemente denominadas de leguminas e vicilinas. Apesar da heterogeneidade das proteínas de reserva nas diferentes espécies, e até dentro de uma única espécie (DESHPANDE et al., 1987), as globulinas 7S e 11S têm sido também identificadas para outras sementes de leguminosas (SIMON et al., 1985), indicando uma suposta origem ancestral comum entre essas proteínas de reserva, posteriormente corroborada em bases moleculares e genéticas (GIBBS et al., 1989; SHUTOV et al.,

1995).

Estudos têm mostrado que as frações 11S e 15S da soja são constituídas de proteínas puras (FRIEDMAN & BRANDON, 2001; CHEFTEL et al., 1989; WOLF, 1970, LIU, 1997). A fração 2S, que representa aproximadamente 20% do total protéico, é composta por proteínas biologicamente ativas e inibidores de tripsina. Como característica das leguminosas, em geral, as globulinas são proteínas majoritárias, inclusive tratando-se da proteína de soja, que apresenta característica insolúvel em água, porém, dissolvem em soluções salinas diluídas em valores de pH acima ou abaixo de seu ponto isoelétrico; quando solubilizadas em solução, mostram-se sensíveis ao tratamento térmico (DURANTI & GIUS, 1997; WOLF, 1970).

As frações globulínicas 7S e 11S representam juntas cerca de 70% das proteínas contidas no grão. O grupo do coeficiente de sedimentação 7, composto pelas enzimas  $\beta$ -amilase, lipoxigenase, hemaglutinina e citocromo C, tem como fração majoritária a globulina denominada  $\beta$ -conglucina, uma glicoproteína de reserva comumente chamada de globulina 7S. A glicina conhecida como globulina 11S, também proteína de reserva, corresponde a 37-45% do conteúdo protéico total da soja, o que garante a esta fração a denominação de proteína principal do grão. A fração 15S (globulina 15S) perfaz cerca de 10% do total de proteínas (CHEFTEL et al., 1989; KOSHIYAMA, 1983).

Como citado anteriormente, as frações 7S (vicilina) e 11S (legumina) representam as principais globulinas da soja (ZHANG, et al., 2002; DURANTI & GIUS, 1997). As vicilinas normalmente não contêm cisteínas e, portanto, não apresentam ligações dissulfídicas (DOMONEY et al., 1986). A vicilina sofre um processo proteolítico mais extenso que a legumina, resultando em grande número de fragmentos polipeptídeos, que, apesar do processo, ainda se mantém associada

à estrutura (GATEHOUSE et al., 1983). Por outro lado, a fração 11S apresenta polipeptídeos ácidos e básicos que contém 3 ou 4 vezes mais metionina e cisteína, por unidade de proteína, que a fração vicilina (FRIEDMAN & BRANDON, 2001; LIU, 1997; WOLF, 1970). A fração 11S (glicinina) torna-se bastante valiosa sob o ponto de vista nutricional, em virtude da deficiência em aminoácidos sulfurados da proteína de soja (KITAMURA, 1995). A proteína glicinina apresenta-se nas formas oligoméricas (normalmente hexâmeros), mas são menos suscetíveis à dissociação, exceto em pH muito baixo (DURANTI & GIUS, 1997; KOSHIYAMA, 1983).

A estrutura da 7S ( $\beta$ -conglucina) é mais heterogênea que a proteína 11S, apresentando glicosilação assimétrica entre suas subunidades (SCHOLZ et al., 1983). É geralmente formada de um trímero de polipeptídeos de 40000-75000 Daltons, constituindo uma proteína nativa de aproximadamente 150000-170000 Daltons (WOLF, 1970). As propriedades de associação-dissociação são intensamente dependentes do pH e força iônica. A estrutura química constituída das três subunidades  $\alpha'$  57-83 kDa (Figura 2),  $\alpha$  57-76 kDa e  $\beta$  42-53 kDa interagem para formar cerca de 6 isômeros, conhecidos como B1 a B6. Outra subunidade  $\beta'$  foi observada em algumas variedades de soja, onde juntamente com a  $\beta$  são ricas em asparagina, glutamina, leucina, arginina e deficientes em metionina. As subunidades  $\alpha$  e  $\alpha'$  são similares quanto à composição de aminoácidos, caracterizada pela elevada concentração de cisteína e baixa em metionina (FRIEDMAN & BRANDON, 2001; LIU, 1997).

A importância da proteína de soja mostrou-se, por muito tempo, subestimada, devido à sua limitação em aminoácidos sulfurados, especialmente em metionina, comparado às quantidades encontradas em alimentos de origem animal (DURANTI, 2006; DURANTI & GIUS 1997; SGARBIERI 1996). Por outro lado, estas

duas fontes apresentam condições antagônicas, quando analisadas pelo aspecto funcional. A proteína animal, embora seja considerada uma fonte completa de aminoácidos, proporciona ação hipercolesterolemica, contraposto aos efeitos hipocolesterolemico das fontes vegetais, propriedade evidente na proteína da soja (SIRTORI et al., 2007).

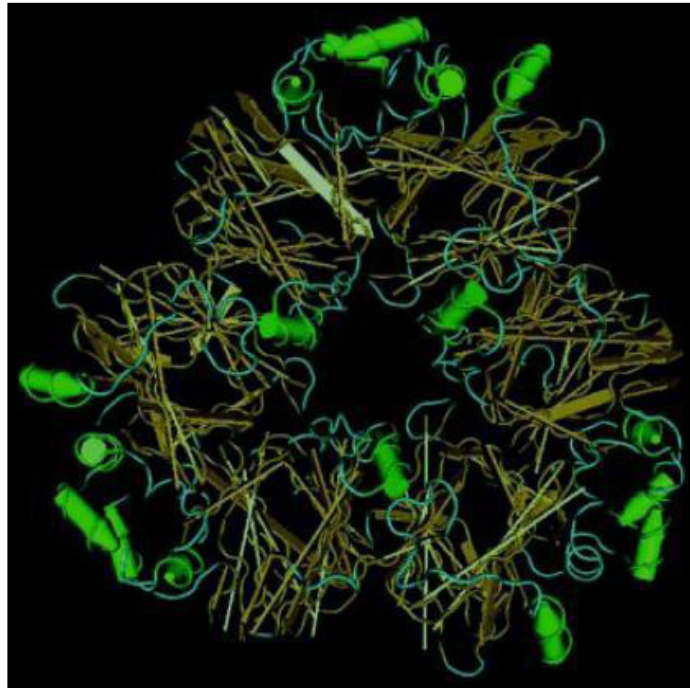


Figura 2. Trímero de polipeptídeos da fração  $\alpha'$  da  $\beta$ -conglucina. *Fonte:* WANG & MEJIA, 2005.

A proteína de soja apresenta grande interesse científico e numerosos indicadores de publicação, em virtude de seus efeitos observados na regulação dos genes envolvidos no metabolismo do colesterol e triacilglicerídeo (SHUKLA et al., 2007; SIRTORI et al., 2007), enzimas hepáticas (TORRES, et al. 2006), redução da lipotoxicidade (TORRES, et al. 2006) e aumento da oxidação dos triacilgliceróis pelo aumento da remoção de partícula LDL, devido ao acréscimo dos receptores no

fígado (SHUKLA et al., 2007; MANZONI et al., 2003; LOVATI et al., 2000; LOVATI et al., 1996; LOVATI et al., 1992).

### **3.5. Proteína de soja x metabolismo lipídico**

O consumo da proteína de soja, em animais (SIRTORI et al., 2008; DURANTI et al., 2004) bem como em humanos (SIRTORI et al., 2007; REYNOLDS et al., 2006; ANDERSON et al. 1995; HUFF, et al., 1977), demonstra redução significativa de colesterol sérico. A proteína da soja tem sido relacionada ao metabolismo lipídico, comparada com as proteínas de origem animal desde 1940 (MEEKER & KESTEN, 1941), porém, não havia evidências suficientes a respeito dos efeitos, bem como dos componentes que poderiam estar associados (ANTHONY et al., 1996). Posteriormente, outros estudos epidemiológicos observaram relação positiva na redução da incidência de doenças cardiovasculares no Japão e em outros países asiáticos, onde a ingestão de soja e produtos à base da proteína era representativa e maior. Nestas regiões, as concentrações séricas de colesterol e incidência de doenças cardiovasculares eram significativamente menores (SACKS et al., 2006; NAGATA et al., 1998; KEYS, 1980). Por outro lado, alguns estudos mostraram que estes efeitos não pareciam evidentes em humanos (VAN RAAIJ et al., 1981; VAN RAAIJ et al., 1982; SACKS et al., 1983).

Dentre os compostos químicos associados à proteína de soja que têm sido reportados na alteração do metabolismo do colesterol, encontram-se os inibidores de tripsina, fibras, saponinas, ácido fítico isoflavonas, aminoácidos e peptídeos (CARROL et al., 1999; CARROL & KUROWSKA, 1995; POTTER 1995; CARROL 1992). Estudos a partir dos anos de 1970 demonstraram, pela substituição da proteína animal pela vegetal, principalmente de soja, uma associação aos efeitos

hipocolesterolemicos (SIRTORI et al., 1977; SIRTORI et al., 1979; CARROLL, 1982). Durante a década de 70 a 80, os estudos de composição de aminoácidos foram intensificados na tentativa de explicar o efeito nos lípides séricos e redução dos riscos da aterosclerose (BALOGUN et al., 1982; HUFF et al., 1977; HUFF e CARROLL, 1980; KRITCHEVSKY, 1979; NAGATA et al., 1982). Em geral, não foi encontrada relação entre aminoácidos e os efeitos observados. Ainda nessa década, Sirtori et al., (1979) e Descovich et al., (1980) postularam que a proteína de soja era capaz de reduzir o LDL-C de 20 a 30% nos casos de hipercolesterolemia severa em humanos.

A partir dos anos 90, muitos estudos têm sido realizados com compostos de isoflavona (ANTHONY et al., 1996, BALMIR et al., 1995). Estes componentes químicos mostram efeitos hipocolesterolemicos quando associado à proteína da soja (DOUGLAS, et al., 2006; ADAMS, et al., 2002; GREAVES, 2000; GREAVES et al., 1999; CROUSE, 1999; HODGSON et al., 1998; KIRK et al., 1998; TOVAR-PALACIO et al., 1998; ADAMS et al., 1997; ANTHONY et al., 1996; MANNING et al., 1996). Entretanto, diferentes estudos com suplementação da isoflavona em humanos (MEINERTZ et al., 2002; SIMONS et al., 2000; HOWES et al., 2000; NESTEL et al., 1999; CROUSE, 1999; HODGSON et al., 1998; NESTEL et al., 1997) e em animais (GREAVES, 2000; GREAVES et al., 1999; ADAMS et al., 1997; MANNING et al., 1996), não demonstraram redução significativa da concentração sérica do colesterol total ou LDL-C. Por outro lado, a remoção destes compostos do isolado protéico da soja não alterou os resultados observados pelo efeito de ingestão nos níveis de colesterol total e triacilglicerídeo (DURANTI et al., 2004; FUKUI et al., 2002, LICHTENSTEIN et al., 2002; AOYAMA et al., 2001).

Uma meta-análise publicada em 1995, na tentativa de evidenciar alguma

relação em meio muitos estudos divergentes a respeito da proteína de soja e os lipídios séricos, sugeriu uma tendência positiva encontrada em resultados de 38 estudos, envolvendo 743 indivíduos (ANDERSON et al., 1995). Este estudo mostrou uma significativa redução do colesterol total (9,3%), LDL-C (12,9%) e triacilglicerídeo (10,5%). Resultados semelhantes foram observados por Lichtenstein et al., (2002). Deste modo, favoreceram-se novos estudos do efeito da proteína de soja no processo hipercolesterolêmico, embora com limitações. Contudo, nenhuma relação evidente foi encontrada entre isoflavonas, colesterol total e LDL-C (SACKS, et al., 2006).

O número de estudo tem se intensificado nos último 10 anos, que resultou em evidências sobre o consumo da proteína de soja em vários aspectos ligados ao metabolismo lipídico (CLARKSON, 2002). Os efeitos observados inicialmente em animais hipocolesterolemicos foram confirmados em diversos estudos conduzidos em humanos (REYNOLDS et al., 2006; ROSELL et al., 2004; TONSTAD et al., 2002; SANDERS et al., 2002; WONG et al., 1998). Embora os resultados reportem redução significativa, as diminuições mostram-se entre 6-12% do colesterol total (FRIEDMAN & BRANDON, 2001), além da redução da LDL-C, triacilglicerídeo e aumento da lipoproteína HDL-C (SIRTORI et al., 2007; REYNOLDS, et al., 2006).

Um possível mecanismo deste efeito seria habilidade de se modular os receptores de LDL, aumentando a captação e oxidação no fígado (CARROLL & KUROWSKA, 1995). Uma segunda hipótese, observada em animais, seria a relação entre os aminoácidos lisina/arginina, que alterariam a relação insulina/glucagon quando alimentados com proteínas de soja, já que o aumento na proporção insulina/glucagon provoca eventual aumento do risco de DCV, resultado da ação hiperlipidêmica e aterogênica desta relação (TORRES et al., 2006; SANCHEZ et al.,



1991; SANCHEZ et al., 1988). As fibras apresentam capacidade de alterar a excreção de colesterol e sais biliares nas fezes, aumentando o “turnover” hepático, sendo postulada a hipótese desses efeitos na proteína de soja. Porém, estudos mostram que os produtos protéicos de soja apresentam quantidades não significantes deste nutriente para que ele exerça este efeito (ERDMAN, 2000).

A proteína de soja ganhou, assim, uma notável atenção, em virtude do potencial em melhorar fatores de risco para doenças cardiovasculares. Em outubro de 1999, a US Food and Drug Administration (FDA) postulou a recomendação de ingestão da proteína de soja na prevenção de doenças do coração. O FDA, baseado em levantamento de estudos clínicos, indicou que o consumo de 25g de proteína de soja por dia, ou mesmo, de 6,25g nas refeições, pelo menos 4 vezes ao dia, reduziria o colesterol total e LDL-C. O FDA declarou que as evidências não sustentam uma ação significativa das isoflavonas presente na soja em relação ao metabolismo lipídico (FOOD LABELING, 1999). A redução do colesterol sérico pela ingestão de produtos protéicos à base de soja está bem documentada, porém, não existem estudos populacionais de longa duração que caracterizem a diminuição das incidências de DCV. Além disso, o mecanismo pelo qual a proteína exerce efeito hipocolesterolemico não foi totalmente elucidado (SIRTORI et al. 2007; DURANTI et al., 2007; ADAMS et al., 2002; LOVATI et al., 2000; WASHBURN et al., 1999). Kohro et al., (2006) reportaram redução significativa de 14% no TG e aumento de 5% no HDL-C, em estudo com 138 voluntários com idade entre 26-69 anos, que apresentavam concentração de triacilgliceróis igual ou acima de 1,69 mmol/L, tratados com  $\beta$ -conglucina (0,63g) ou placebo (0,63g caseína) durante 12 semanas, Estes resultados foram corroborados com redução do TG nas frações de VLDL-C, LDL-C e HDL-C. No segundo teste, com 102 voluntários, que apresentavam índice de

massa corpórea entre 25 e 30, tratados por 20 semanas, mostraram redução na gordura visceral comparados ao grupo placebo.

Sirtori et al., (1984) compararam o efeito hipocolesterolemico da proteína de soja em relação à caseína, indicando envolvimento de componentes peptídicos na regulação de receptores hepáticos ligados às lipoproteínas. Os grupos delineados foram: caseína (C), caseína (CCol) e soja (SCol) acrescida de colesterol (1,2%). Houve aumento significativo nos níveis séricos de colesterol total, VLDL-C e LDL-C do grupo CCol comparado ao C. Os animais alimentados com proteína de soja tiveram redução sérica do colesterol total, triacilglicerol, colesterol livre, esterificado e massa hepática, além de promover atenuação do efeito do colesterol na atividade das enzimas HMG-CoA redutase, colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilase e acil-CoA:colesterol O-aciltransferase (ACAT).

Um dos primeiros estudos de LOVATI et al. (1987), nos anos 80, mostrou que a dieta com proteína de soja reduziu em 15,9% o colesterol total e 16,4% da LDL-C, em indivíduos hipercolesterolêmicos, quando comparado aos tratados com fonte protéica animal, já indicando que a proteína de soja era o componente responsável pelos efeitos no metabolismo no lipídico, a partir da indução na expressão de receptores LDL, como evidenciado em resultados *in vitro* em cultura de células humanas.

Desde meados da década de 1990, alguns estudos com as diferentes frações globulínicas da soja isoladas e polipeptídeos, vêm sendo conduzidos e sugerem um possível efeito dessas frações no metabolismo dos lípidos (SUGANO et al., 1997; LOVATI et al., 1996; SIRTORI, 1995; LOVATI et al., 1992). Lovati et al. (1992) reportaram a hipótese de que as frações protéicas da soja, 7S e 11S, teriam capacidade de modular os receptores de atividade da LDL. Com isto, estudos mais

recentes vêm atribuindo estes efeitos a um ou mais peptídeos formados durante a digestão da proteína de reserva da soja, observando outros efeitos ligados à proteína de soja (PAK et al., 2005; DURANTI et al., 2004; MORIYAMA et al., 2004; MANZONI et al., 2003; LOVATI et al., 2000).

Aoyama et al. (2000) observaram, em ratos que receberam proteína isolada de soja íntegra ou hidrolisada, redução do colesterol total, triacilglicerol, glicose, peso hepático e tecido adiposo, em relação à caseína. Entretanto, a deposição de gordura foi significativamente reduzida somente no experimento conduzido em camundongos espontaneamente obesos. Por outro lado, após secagem da carcaça dos animais, foi observado o aumento da massa muscular e a diminuição da gordura corporal nos dois experimentos, sendo que os resultados do grupo com proteína hidrolisada foram mais expressivos comparados à proteína íntegra, postulando alternativa no controle de ganho de peso. Aoyama et al. (2001) reportaram, em ratos jovens e adultos, redução do peso hepático, mas não do tecido adiposo, quando tratados com isolado protéico de soja e proteína  $\beta$ -conglucina, em relação à caseína. Não foram observadas alterações no consumo, peso final, eficiência alimentar e glicose circulante, entre os tratamentos. Por outro lado, as concentrações séricas de colesterol total, triacilgliceróis e índice aterogênico foram menores nos animais tratados com isolado, sendo mais relevante no grupo da  $\beta$ -conglucina.

Madani et al. (2000) observaram, em ratos alimentados com caseína ou proteína de soja nas concentrações de 10, 20 e 30%, redução do peso corporal e hepático, mas não houve alterações significativas nas concentrações lipídicas sérica entre os tratamentos. Porém, sugeriu-se que a quantidade e tipo de proteína desempenhariam importante relação com o metabolismo das lipoproteínas e o

aumento da sensibilidade dos tecidos a peroxidação lipídica, desempenhando efeito secundário na regulação do colesterol.

Fukui et al. (2002) verificaram, em ratos tratados com isolado protéico de soja isento de compostos de isoflavonas, redução significativa da concentração sérica do colesterol total, comparado ao grupo caseína. A adição do concentrado de isoflavona em um grupo caseína ou mesmo no isolado protéico não influenciaram este parâmetro lipídico. Efeitos semelhantes foram encontrados para excreção de esteróide fecal. Deste modo, os resultados mostraram que o fator hipocolesterolêmico estaria relacionado diretamente com componentes protéicos da soja. Chen et al. (2003) observaram, em ratos *Wistar* hipercolesterolêmicos (1% colesterol e 0,25% de ácido cólico), tratados com 2, 5 e 10% da fração não-digerida resultante da hidrólise protéica da soja, redução sérica significativa do colesterol total, triacilglicerídeo, VLDL-C e VLDL-C nos grupos com 5 e 10% da fração. O colesterol, o triacilglicerídeo e o peso hepático foram menores nos grupos tratados, que apresentavam concentração de colesterol e ácidos biliares totais excretados nas fezes aumentados. No entanto, não houve diferença estatística comparado ao controle para esses parâmetros. Dados semelhantes foram encontrados para ganho de peso corpóreo, ingestão, o coeficiente de eficácia alimentar e índice hepatossomático.

Fukui et al. (2004) observaram, no fígado de ratos tratados com  $\beta$ -conglucininina, aumento da atividade da enzima carnitina palmitoiltransferase e redução da ácido graxo sintetase, associados com acréscimo da excreção fecal relativa e de ácidos graxos, que postulam hipótese ligada à proteína na modulação da síntese no fígado, como agente estimulante da  $\beta$ -oxidação mitocondrial e excreção fecal de ácidos graxos.

Moriyama et al. (2004), em camundongos normais e espontaneamente obesos tratados com  $\beta$ -conglucina e glicina, demonstraram efeitos no ganho de peso, tecido adiposo e hepático. A  $\beta$ -conglucina promoveu redução mais significativa do triacilglicerídeo sérico, comparado a glicina, associado à diminuição da atividade enzimática da ácido graxo sintetase e aumento da Acil-CoA oxidase, enzima relacionada a oxidação ácidos graxos hepático, confirmada pelo acréscimo da expressão mRNA desta enzima. Porém, esses resultados não foram acompanhados de alteração da excreção de triacilglicerídeo e colesterol nas fezes.

Rho et al. (2007) isolaram um peptídeo a partir de uma soja “preta” chamado de peptídeo de soja preta - BSP (black soy peptide). *In vivo*, utilizando ratos alimentados com BSP em 2, 6 e 10% do valor calórico da dieta, observaram redução significativa do peso corpóreo, acentuado proporcionalmente pelo aumento da concentração, sem incidir com alteração da ingesta dos animais. A excreção fecal, por sua vez, foi significativamente maior no grupo caseína, comparado ao BSP 2%, BSP 6% e semelhante ao BSP 10%. Houve ainda, redução do tecido adiposo, peso, colesterol, triacilglicerídeo hepático, acompanhados da diminuição sérica do colesterol total, triacilglicerídeo, VLDL-C, LDL-C e índice aterogênico. O HDL-C foi significativamente aumentado, mostrando relação com a concentração de BSP. Por outro lado, essas reduções não foram acompanhadas do aumento da excreção de colesterol e triacilglicerídeo nas fezes.

Lovati et al. (2000) demonstraram que a regulação do colesterol, em estudo com células Hep G2, ocorria pelo efeito das frações globulina 7S e, em menor intensidade, pela 11S. Todavia, os resultados sustentam a hipótese de que a proteína desprovida dos componentes de isoflavona seja a provável responsável pelos efeitos no metabolismo lipídico. Estudos *in vitro* realizados com células

mononucleares Hep G2 evidenciam que a  $\beta$ -conglucina modula a ativação e aumento de receptores da LDL, promovendo aumento na captação e degradação desta pelas células hepáticas (MANZONI et al., 2003; LOVATI et al., 2000). As células incubadas na presença da subunidade protéica ( $8 \times 10^{-6} M$ ) mostraram aumento da captação de LDL-C em 192% e degradação em 143%, comparada ao controle. Efeito semelhante foi observado quando as células foram incubadas na presença de simvastatina. Estes resultados foram confirmados pelo acréscimo no mRNA do SREBP2 e mRNA dos receptores LDL (LOVATI et al., 2007).

Pak et al. (2005), em experimentos *in vitro*, utilizando hidrolisados da proteólise da glicina com diferentes enzimas, demonstraram atividade hipocolesterolemica desta fração. Resultados semelhantes foram obtidos em experimento com ratos *Sprague-Dawley* alimentados com dieta hipercolesterolêmica e globulina 7S isolada de soja, em um período de 28 dias (DURANTI et al., 2004). Os dados sugerem um possível mecanismo de interação com sais biliares e inibição da enzima HMG-CoA redutase. Outros estudos sugerem que este efeito decorre da interação dos peptídeos com colesterol e seus metabólitos, promovendo assim sua excreção (AOYAMA et al., 2000; IWAMI et al., 1986). Recentemente, Shukla et al. (2007), Torres et al. (2006) e Brandsch et al. (2006) reportaram como conseqüência a modulação do SREBP na expressão do gene SREBP-1c, envolvido na síntese de triacilglicerídeo e colesterol.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Local do experimento

O estudo foi realizado nos Laboratórios de Bioquímica de Alimentos e de Nutrição Experimental do Departamento de Alimentos e Nutrição, localizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR), da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

### 4.2. Material

A farinha de soja comercial utilizada na obtenção da fração protéica  $\beta$ -conglucina empregada no estudo *in vivo* foi obtida na região de Araraquara – SP.

#### 4.2.1. Extração da fração lipídica da farinha de soja

A farinha de soja, com granulação de 60 mesh, foi desengordurada utilizando-se n-hexano, na proporção de 1:8 massa-volume, por um período de 4 horas sob agitação, à temperatura ambiente (22°C), com repetição do processo na proporção 1:6 m/v, por mais 4 horas, após a troca do solvente. Posteriormente, fez-se filtração e secagem à temperatura ambiente, por 24 horas. A farinha desengordurada foi estocada em câmara fria a 4°C.

A composição química foi determinada de acordo com metodologia descrita pela Association Official Analytical Chemistry (AOAC, 1998). A determinação da umidade foi realizada por gravimetria, após secagem em estufa a 105 °C. A determinação de proteína foi feita pelo método de Kjeldahl, o lipídeo foi determinado em Soxhlet com extração em hexano, as cinzas, por calcinação da amostra à temperatura de 550°C, e o carboidrato foi calculado por diferença.

#### 4.2.2. Extração e isolamento da proteína $\beta$ -conglícinina da soja

Para obtenção da  $\beta$ -conglícinina, a partir da farinha desengordurada de soja, foram realizados os procedimentos descritos por NAGANO et al. (1992).

Primeiramente, foi realizada a extração da proteína total da farinha desengordurada, utilizando-se água destilada na proporção de 1:15 m/v, pH 7,5, ajustado com NaOH 2N, em temperatura ambiente durante uma hora, sob agitação. Em seguida, o material foi centrifugado a 7000rpm durante 60 minutos. O precipitado foi descartado e, ao sobrenadante, à temperatura de 4 °C, adicionou-se metabisulfito de sódio na relação de 0,98g/L, sendo o pH ajustado para 6,4, permanecendo “*overnight*”. O material foi centrifugado em 6500rpm por 20 minutos. O precipitado contendo a fração globulina 11S foi descartado, e o sobrenadante foi levado à concentração de 0,25 mol/L de NaCl, o pH levado à 5,0 com adição de HCl 2N, permanecendo durante uma hora em repouso. Posteriormente, o material foi centrifugado a 7000rpm, durante uma hora. O precipitado foi descartado e o sobrenadante diluído (duas vezes) em água destilada, levado ao pH 4,8, e mantido “*overnight*”. Por fim, o material foi centrifugado a 6500rpm, por 30 minutos, e o precipitado, contendo a fração globulina 7S, foi recolhido por solubilização em solução tampão fosfato de sódio a 0,25 mol/L, pH 7,0 seguido de armazenamento à temperatura de -24 °C (Figura 3).



### 4.3. Métodos

#### 4.3.1. Determinação da proteína

As proteínas, em todas as etapas do isolamento, foram determinadas pelo método de LOWRY et al. (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

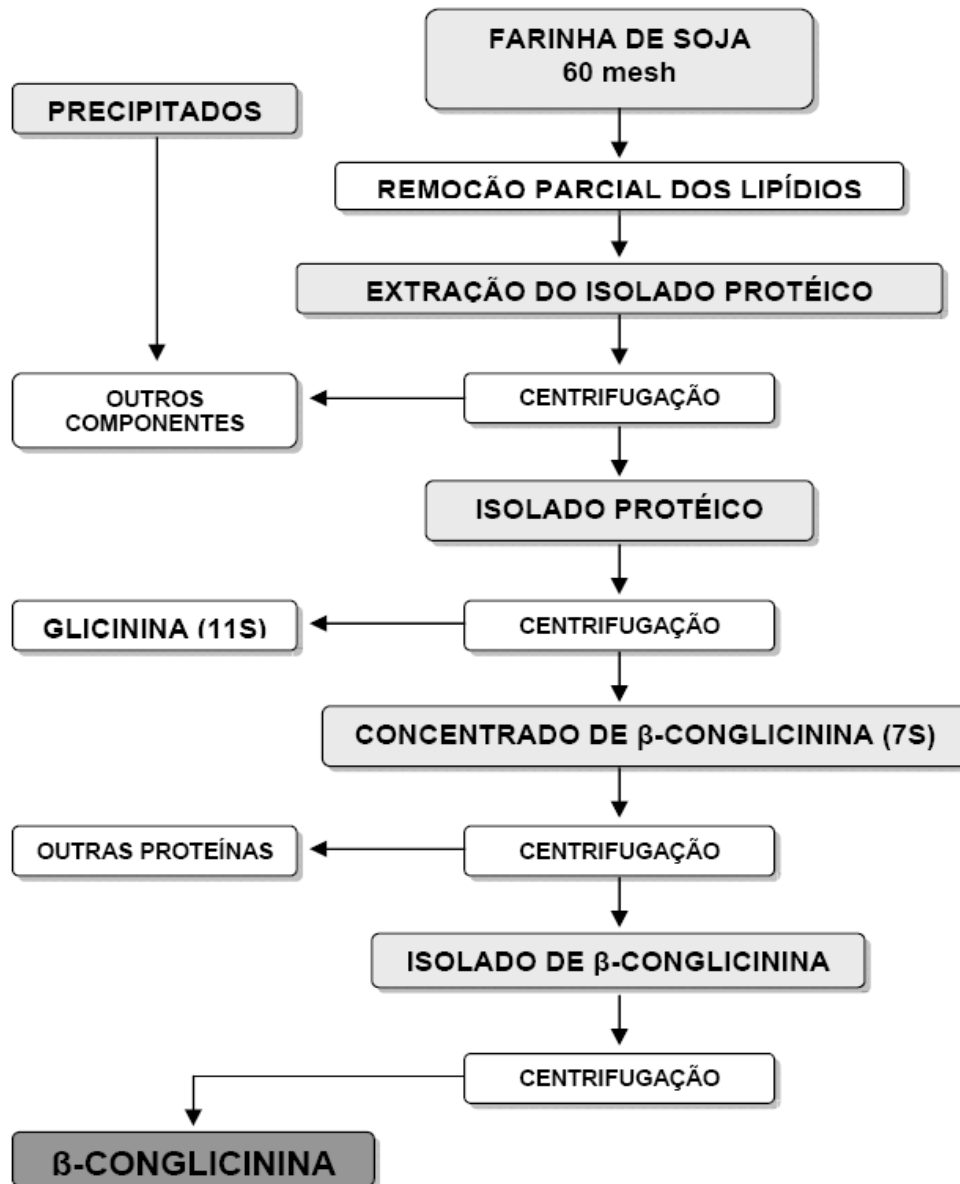


Figura 3. Fluxograma de obtenção da fração protéica globulina 7S. Adaptado e modificado a partir de NAGANO et al. (1992).

#### 4.3.2. SDS-PAGE da proteína globulina 7S

As proteínas isoladas foram analisadas por SDS-PAGE, para a identificação do peso molecular, conforme método descrito por LAEMMLI (1970), utilizando gel de poliacrilamida 12%. Os géis, após eletroforese por 3 horas a 150 V, foram corados com Comassie Blue R 250, e descorados com solução de ácido acético/metanol/água. As seguintes proteínas padrões de peso molecular foram utilizadas para determinação de massa molecular: fosforilase b (94 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbonica (29 kDa), inibidor de tripsina de soja (21.5 kDa) e citocromo C de coração de cavalo (12,4 kDa). Os géis foram reproduzidos em scanner (alpha Innotech<sup>®</sup>), e analisados por densitometria com software alpha Imager version 6.0, para identificação e quantificação das subunidades.

#### 4.2.3. Ensaio biológico

O ensaio biológico teve como objetivo principal testar o efeito da administração da  $\beta$ -conglucina, nas concentrações de 200 e 300mg por quilo de peso do animal por dia, em parâmetros lipídicos plasmáticos e hepáticos, comparando e testando com efeitos resultantes da administração de 30mg por quilo de peso do animal por dia do medicamento fenofibrato. Para isso, utilizaram-se animais submetidos a dietas específicas conforme descrito abaixo.

##### 4.2.3.1. Dietas

Foram elaboradas duas dietas experimentais, conforme as recomendações de composição para ratos e roedores, sugeridos pela *American Institute of Nutrition* - (AIN-93M) e descrito por Reeves et al. (1993). A primeira foi uma dieta padrão

normal e uma segunda, considerada hipercolesterolemica, acrescida de 1% de colesterol e 0,5% de ácido cólico (NATH et al. 1959). As dietas foram produzidas pela empresa PragSoluções<sup>®</sup> Ltda, variando-se apenas o conteúdo de amido entre as formulações, como descrito na Tabela 2.

#### 4.2.3.2. Animais experimentais

Foram utilizados 54 ratos machos adulto-jovens (*Rattus norvegicus* var. *Albinus*), linhagem *Wistar*, com 7 semanas de idade, peso inicial de  $148 \pm 12,3\text{g}$ , provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP), *Campus* Botucatu. Os animais permaneceram no local do experimento por uma semana, em gaiolas coletivas, seis animais por gaiola, à temperatura controlada de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclo de claro-escuro de 12 horas, recebendo ração comercial Purina<sup>®</sup> e água *ad libitum*, para adaptação e aquisição do peso ideal, entre 180 e 200 gramas. Todos os procedimentos realizados com os animais foram executados de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (*National Research Council*, 1985), após análise e aprovação do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, sob parecer protocolado de número 19/2007.

Tabela 2. Composição das dietas experimentais ofertadas durante 28 dias.

INGREDIENTE (g/kg dieta)	STD	HC	HC+7S <sup>1</sup>	HC+7S <sup>2</sup>	HC+FF	HC+7S <sup>2</sup> +FF
Caseína <sup>#</sup>	147,4	147,4	147,4	147,4	147,4	147,4
Amido	458,3	443,3	443,3	443,3	443,3	443,3
Amido dextrinizado	155,0	155,0	155,0	155,0	155,0	155,0
Sacarose	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Óleo de soja	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0
Celulose	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Mistura mineral <sup>‡</sup>	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0
Mistura vitamínica <sup>‡</sup>	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
L-Cistina	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Birtarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Colesterol*	0,00	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Ácido cólico <sup>#</sup>	0,00	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Proteína (% energia)	22,8	23,3	23,3	23,3	23,3	23,3
Lipídio (% energia)	6,3	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
Carboidrato (%energia)	70,9	70,2	70,2	70,2	70,2	70,2
Tratamento						
β-conglicina (mg/kg/day)	---	---	200,0	300,0	---	300,0
Fenofibrato (mg/kg/day)	---	---	---	---	30	30

# Reagentes da sigma<sup>®</sup>; ‡ Fornecido pela PragSoluções<sup>®</sup>. \*Reagente da Reagen<sup>®</sup>. STD = Grupo padrão; HC = Grupo hipercolesterolêmico; HC+7S<sup>1</sup> = Grupo 7S 200mg; HC+7S<sup>2</sup> = Grupo 7S 300mg; HC+FF = Grupo fenofibrato 30mg; e HC+7S<sup>2</sup>+FF = Grupo 7S 300mg associado à Fenofibrato 30mg.

#### 4.2.4. Protocolo experimental

Os animais experimentais foram divididos em seis grupos, permanecendo nove animais em cada grupo experimental ( $n=9$ ), e mantido em gaiolas individuais (Figura 4). O primeiro grupo recebeu a dieta normal sem qualquer tipo de tratamento. O segundo grupo (HC) recebeu a dieta hipercolesterolemica, sendo administrado apenas o veículo ausente de proteína. O terceiro (HC+7S<sup>1</sup>) e quarto grupos (HC+7S<sup>2</sup>) receberam a dieta hipercolesterolemica, sendo administrada a proteína  $\beta$ -conglucina solubilizada em solução salina, em doses de 200 e 300mg/kg de peso corporal/dia, respectivamente. Os grupos cinco (HC+FF) e seis (HC+7S<sup>2</sup>+FF) também receberam a dieta HC e foram tratados com 30mg/kg de peso corporal/dia de fenofibrato, e 300mg/kg de  $\beta$ -conglucina associado à 30mg/kg de fenofibrato simultaneamente, respectivamente (Tabela 3).



Figura 4. Distribuição individual dos animais em gaiolas de contenção.

A administração das doses da proteína  $\beta$ -conglucina e da droga hipolipemiante foi realizada diariamente as 9 e 14 horas, respectivamente, considerando o peso corpóreo dos animais durante os 28 dias do experimento. A administração foi realizada por técnica de gavagem, com o animal imobilizado, por meio de tração manual da pele da região dorsal (Figura 5).

TABELA 3. Grupo de animais e os diferentes tratamentos durante os 28 dias do experimento.

GRUPOS	DIETA	TRATAMENTO
I. Padrão (STD)	Normal	Ausente
II. HC	Hipercolesterolêmica	Veículo
III. HC+7S <sup>1</sup>	Hipercolesterolêmica	200mg de $\beta$ -conglucina (7S <sup>1</sup> )
IV. HC+7S <sup>2</sup>	Hipercolesterolêmica	300mg da 7S <sup>2</sup>
V. HC+FF	Hipercolesterolêmica	30mg de Fenofibrato
VI. HC+7S <sup>2</sup> +FF	Hipercolesterolêmica	(7S <sup>2</sup> ) + Fenofibrato



Figura 5. Administração da proteína  $\beta$ -conglucina.

#### 4.2.5. Crescimento ponderal, consumo alimentar e excreção fecal

As pesagens dos animais foram realizadas de dois em dois dias, sempre nos mesmos horários, em balança semi-analítica com precisão de 0,5g. A ingestão foi determinada pela diferença do peso da dieta ofertada no dia anterior em relação às sobras do dia posterior, pesadas em balança analítica com precisão de 0,01g. As fezes foram coletadas, secas em estufa à temperatura de 60°C “overnight”, posteriormente, pesadas em balança analítica com precisão de 0,01g, armazenadas e conservadas em temperatura de congelamento de -24 °C para posteriores análises comparativas do comportamento entre os grupos que receberam diferentes tratamentos durante os 28 dias do período experimental.

#### 4.2.6. Eficácia Alimentar (EA)

A eficácia alimentar foi calculada a partir do monitoramento do ganho de peso em relação ao consumo alimentar diário, sendo medido a partir da seguinte

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

Onde: Gp = ganho de peso; Ca = consumo alimentar.

#### 4.2.7. Coleta do material biológico

Ao final dos 28 dias do experimento e após 12 horas de jejum, os animais foram sacrificados por decapitação. O sangue foi coletado em tubos contendo gel separador SST II (Vacutainer BD<sup>®</sup>), e em seguida centrifugado a 1900g por 15 minutos. O soro foi recolhido, armazenado sob congelamento à -20°C, para posteriores análises bioquímicas. A gordura retroperitoneal, o fígado e coração foram removidos, lavados em solução salina (9g NaCl/L), pesados, imediatamente congelados e armazenados à -20 °C, para subsequente análises comparativas entre os grupos experimentais.

#### 4.2.8. Análises bioquímicas séricas

Foram realizadas análises séricas de colesterol total, HDL-colesterol e triglicérides por meio de métodos enzimáticos utilizando *kits* da marca Labtest<sup>®</sup>.

O colesterol total foi determinado pela oxidação do colesterol pela ação da colesterol oxidase (COD), com prévia hidrólise dos ésteres de colesterol pela colesterol esterase (COE). O colesterol era oxidado, produzindo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Este composto produzia a ligação oxidativa do fenol com a 4-aminofenazona (4-AF), catalisada pela peroxidase (POD), com a formação de uma quinoneimina vermelha, com um máximo de absorção em 500nm. A intensidade da



coloração formada é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra e estável por 60 minutos.

Para o triacilglicerídeo, a metodologia teve como princípio a hidrólise dos triglicerídeos pela lipase lipoprotéica (LPL), produzindo glicerol e ácidos graxos. O glicerol era fosforilado com ATP na presença da glicerol quinase (GK), formando glicerol-3-fosfato, o qual foi oxidado liberando peróxido de hidrogênio na presença da enzima glicerol fosfato oxidase (GPO). O  $H_2O_2$ , na presença da 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, numa reação catalisada por uma peroxidase (POD), formou a 4-p-benzoquinona-monoiminofenazona, que possui um máximo de absorção em 505nm.

A determinação desta fração HDL-C foi realizada inicialmente pela precipitação seletiva das lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL, respectivamente), mediante adição do ácido fosfotúngstico. No sobrenadante, separado por centrifugação, permaneciam as lipoproteínas de alta densidade (HDL). A determinação do colesterol ligado a estas lipoproteínas seguiu as reações descritas para colesterol total.

A fração não-HDL-C (LDL-C + VLDL-C) foi calculada pela diferença entre colesterol total e o HDL-C. A razão colesterol total/HDL-C e o índice aterogênico (IA) calculado pela relação colesterol total-HDL-C/HDL-C foram calculados e comparados entre os grupos experimentais. Os índices hepato-somático e gordura víscero-somático foram calculados pelas seguintes relações, respectivamente, peso do fígado/peso corpóreo x 100, e peso gordura visceral/peso corpóreo do animal x 100.

#### 4.2.9. Análises dos lípides hepáticos

Para determinação do colesterol total e triglicerídeos hepático foi realizada extração de acordo com metodologia descrita por Haug & Hostmark (1987). Amostras dos fígados foram removidas, misturadas a uma solução de isopropílico em concentração de 10% m/v, homogeneizado em Potter-elvehjem durante cinco minutos e mantidos em repouso por 48 horas, à temperatura de 4 °C. Posteriormente, o material foi centrifugado a 1000g por 10 minutos. A partir do sobrenadante obtido, foram realizadas as determinações do colesterol total e triglicerídeos por *kits* enzimáticos de acordo como descrito para as análises séricas.

#### 4.2.10. Análise estatística

Os dados dos seis tratamentos com nove repetições foram analisados utilizando o software SigmaStat<sup>®</sup> 3.5 (Dundas software, Germany, 1999). Os dados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) e pelo teste de *Student-Newman-Keuls* (SNK), para comparação múltipla entre os tratamentos. Foi estabelecido  $P < 0,05$  como nível de significância. Todos os resultados foram apresentados pela média  $\pm$  erro padrão (SEM). O coeficiente de correlação de Pearson foi realizado a partir da análise integral dos dados, considerando todos os tratamentos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Composição química da farinha de soja desengordurada

Os resultados encontrados na composição química da farinha desengordurada de soja utilizada na obtenção da  $\beta$ -conglucina encontram-se expostos na Figura 6.

A farinha desengordurada apresentou uma concentração protéica e lipídica de 51,02% e 6,14%, respectivamente. A matéria mineral representou 6,53% da constituição da farinha. Estes resultados demonstram que a farinha desengordurada apresenta elevada concentração de proteína comparada à média de 38% presente no grão como citado por Kwok et al. (1997).

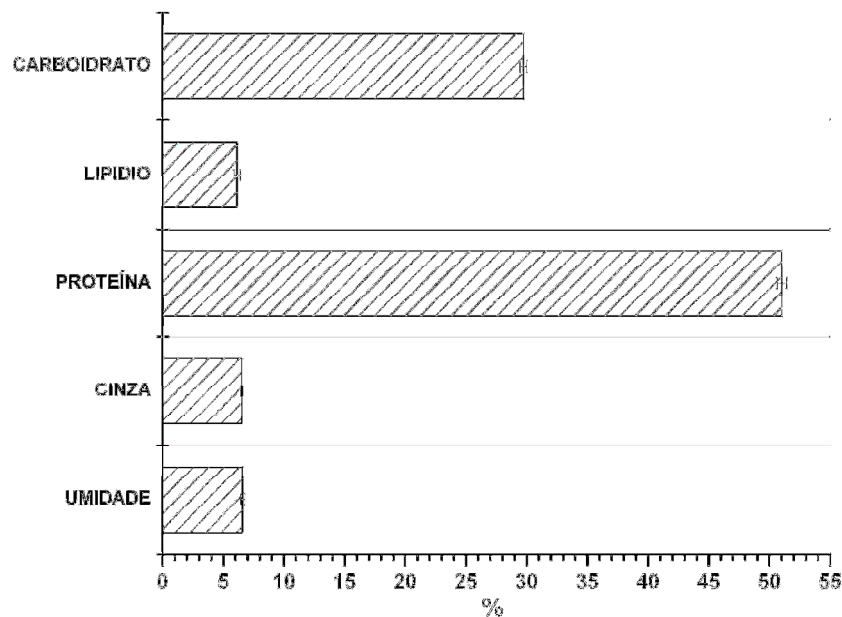


Figura 6. Composição química da farinha de soja desengordurada.

Os concentrados e isolados de soja, além de se tornarem ingredientes de elevado valor nutritivo devido teor protéico, mineral e de fibras, constituem material mais adequado para a realização da extração e isolamento da  $\beta$ -conglucina.

## 5.2. Isolamento da proteína $\beta$ -conglucina

O método de extração da  $\beta$ -conglucina, adaptado e modificado de acordo com metodologia de Nagano et al. (1992), mostrou-se aceitável para obtenção do material necessário para a execução do experimento *in vivo*, como mostrado nas figuras 7 e 8.

O rendimento de 9,23% da 7S em relação à farinha desengordurada foi considerado relativamente baixo, porém, quando relacionado ao conteúdo protéico na farinha, este percentual passou a representar 19,96%. A análise densitométrica mostrou que a fração 7S representa 38,1% do total protéico da farinha, que permitiu o cálculo, a partir da determinação da proteína obtida do processo de extração e isolamento, do rendimento igual a 47,65%. A eficiência na obtenção da proteína torna-se difícil devido à série de etapas necessárias para garantir um isolamento adequado (figura 7).

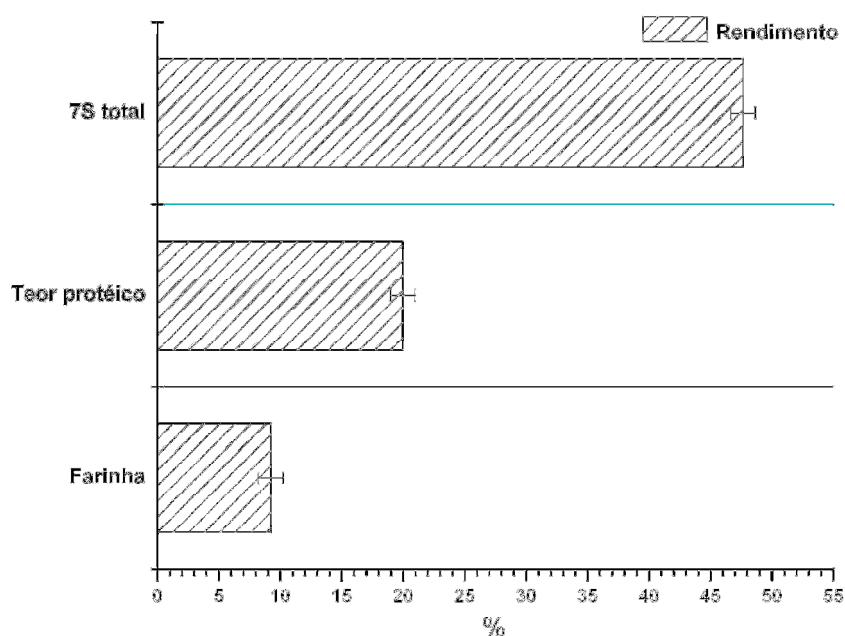


Figura 7. Análise de rendimento na obtenção da  $\beta$ -conglucina.

A figura 8 mostra a eletroforese do isolado protéico da soja (PI), proteína  $\beta$ -conglucina (7S) e glicina (11S) isoladas. A análise por densitometria mostrou que as globulinas constituem 90% do isolado protéico de soja, sendo que a glicina, proteína majoritária, representa 55,2% e a  $\beta$ -conglucina, 38,1% da proteína total do isolado. A relação 11S/7S encontrada foi de 1,44, semelhante às espécies cultivadas no Japão que apresentam relação de 1,28 a 1,70 (tabela 4).

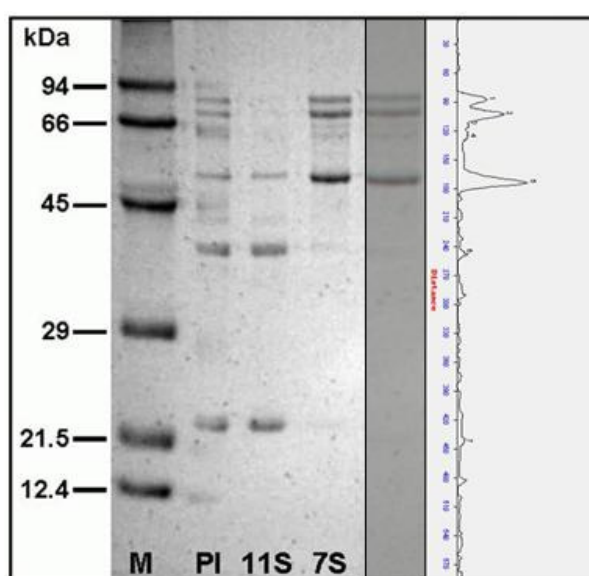


Figura 8. SDS-PAGE em condições redutoras da globulina 7S e suas subunidades separadas de acordo com procedimentos descritos em métodos. Linha PI: extrato protéico total; Linha 11S: globulina 11S isolada (glicina); linha 7S: globulina 7S isolada ( $\beta$ -conglucina); Linha M: proteínas padrão. Amostras aplicadas na faixa de 5 $\mu$ g.

A fração 11S apresentou contaminação de 8,3% da subfração  $\beta$ , que constitui a 7S. Por outro lado, a fração 7S formada pelas subunidades  $\alpha'$ -conglucina,  $\alpha$ -conglucina e  $\beta$ -conglucina, apresentou grau de pureza de 92%, mostrado na figura 8 e descrito na tabela 4. A análise da proteína  $\beta$ -conglucina demonstrou que a fração  $\beta$  representa a principal subunidade, resultados semelhantes aos reportados por Fujita et al. (2001) para os cultivares Hayahikari (Japan), Kitamusume

(Japan) e Akishirome (Japan), que, por sua vez, diferenciam dos cultivares Clark (Egypt), Sangra (U.S.A.) e Bragg (U.S.A.), cuja fração principal é a subunidade  $\alpha'$ .

Tabela 4. Descrição das bandas, massa molecular (MM) e pureza das subunidades do isolado protéico, glicinina e  $\beta$ -conglucina

FRAÇÃO	BANDA	MM	%	SUBUNIDADE
PI	1	82,14	11,9	$\alpha'$ 7S
	2	76,03	12,2	$\alpha$ 7S
	3	70,67	3,8	-
	4	58,14	14,0	$\beta$ 7S
	5	47,83	2,9	acid 11S
	6	41,66	22,6	acid 11S
	7	18,87	32,6	basic 11S
11S	-	58,14	8,3	-
	1	47,83	5,2	acid 11S
	2	41,66	43,8	acid 11S
	3	22,07	42,6	basic 11S
7S	1	82,14	19,7	$\alpha'$ 7S
	2	76,03	25,1	$\alpha$ 7S
	3	58,14	47,4	$\beta$ 7S
	-	41,66	3,5	-
	-	22,07	4,3	-

PI = Isolado protéico, 11S = glicinina e 7S =  $\beta$ -conglucina.

### 5.3. Experimento *in vivo*: crescimento ponderal

A figura 9 mostra o ganho de peso dos grupos experimentais no período de 28 dias. O ensaio *in vivo* demonstrou que os grupos alimentados com a adição de colesterol e ácido cólico (HC; HC+7S<sup>1</sup>; HC+7S<sup>2</sup>; HC+FF; HC+7S<sup>2</sup>+FF) ou não (STD) tiveram crescimento ponderal semelhante durante o período experimental. Estes resultados foram próximos aos reportados por Fukui et al. (2004), Chen et al. (2003) e Kern et al. (2002), que utilizaram o mesmo protocolo para desenvolver hipercolesterolemia em ratos.

Por sua vez, o tratamento com 200 ou 300mg/kg/dia da  $\beta$ -conglucina não mostrou ocasionar alteração no ganho de peso, como pode ser observado nos

grupos HC+7S<sup>1</sup> e HC+7S<sup>2</sup> (Tabela 5). Resultados similares foram reportados por Wilson et al. (2007), Fukui et al. (2002), Kern et al. (2002) com isolado protéico de soja comparado ao grupo caseína, Fukui et al. (2004) com  $\beta$ -conglícinina, e Chen et al., (2003), com a fração não-hidrolisada da proteína de soja. Apenas Rho et al., (2007) observaram redução de 27% do peso corpóreo dos animais tratados com 10% da caloria como fonte protéica de um peptídeo (BSP) de soja preta (black soy peptide).

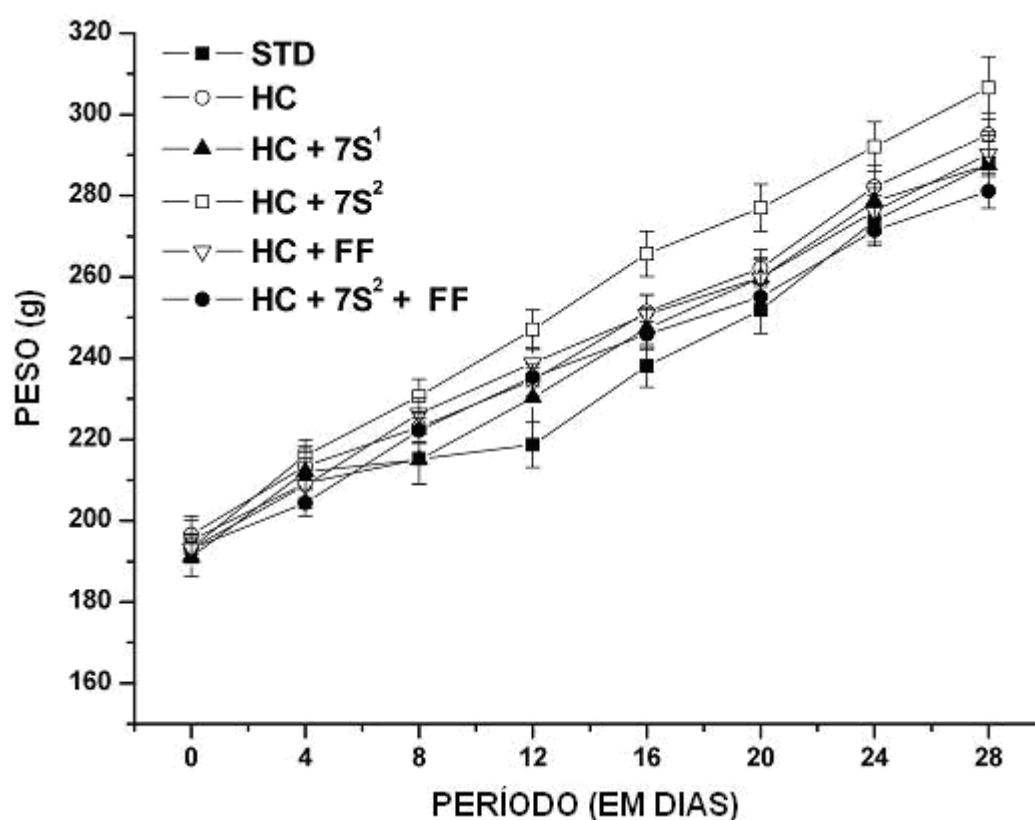


Figura 9. Ganho de peso dos grupos experimentais tratados e não tratados com a proteína  $\beta$ -conglícinina durante 28 dias. Valores representados em média  $\pm$  SEM. STD = Padrão; HC = Hipercolesterolêmico; HC+7S<sup>1</sup> =  $\beta$ -conglícinina 200mg/kg/dia; HC+7S<sup>2</sup> =  $\beta$ -conglícinina 300mg/kg/dia; HC+FF = Fenofibrato 30mg/kg/dia e HC+7S<sup>2</sup>+FF =  $\beta$ -conglícinina 200 e fenofibrato 30mg/kg/dia.

Neste estudo, não foi observada alteração para este parâmetro, quando os grupos (HC+FF e HC+7S<sup>2</sup>+FF) foram tratados com 30mg/kg/dia de fenofibrato. Condição semelhante foi verificada por Tsutsumi et al. (2001) e Yamamoto et al. (1996), utilizando ratos tratados com 30mg/kg/dia e 0,05% na ração, respectivamente. Por outro lado, sabe-se que este medicamento hipolipidêmico provoca significativa redução de peso durante um tratamento prolongado. Sotomayor et al. (2007), após 8 semanas, e Ferreira (2006), passados nove dias, observaram este efeito em ratos *Wistar* tratados com concentração de 100mg/kg/dia do fenofibrato, comparado ao controle. Metais et al. (2008) reportaram, em ratos *Zucker* diabéticos tratados com 100mg/kg/dia, a redução de peso somente a partir da 14<sup>a</sup> semana de tratamento. Dados de Mancini et al. (2001), em ratos *Wistar*, mostrou que a redução no ganho de peso inicia-se a partir da 8<sup>a</sup> semana de tratamento, com uma concentração de 320mg/kg/dia.

Certamente, este efeito não foi observado neste estudo devido ao período de quatro semanas, associado à concentração de 30mg/kg/dia de fenofibrato, empregado no experimento. De tal modo, não foram observadas alterações em outros parâmetros analisados.

#### **5.4. Consumo, eficácia alimentar (EA) e excreção fecal**

A tabela 5 mostra o efeito da dieta, da  $\beta$ -conglucina e do fenofibrato, no consumo, eficácia alimentar e excreção fecal dos grupos experimentais, acompanhados durante 28 dias.

De maneira semelhante ao observado para o ganho de peso, o tipo de dieta STD ou HC não provocou alterações significativas nos parâmetros citados anteriormente, com exceção da excreção fecal, sendo estes resultados semelhantes



aos reportados por Rho et al. (2007), Chen et al. (2003), Fukui et al. (2002), Kern et al. (2002) e Aoyama et al. (2000).

Por outro lado, a excreção fecal foi maior nos grupos alimentados com a dieta suplementada com colesterol. O HC, comparado ao STD, teve aumento de 37,55% do peso seco, sendo ainda que este grupo apresentou acréscimo significativo de 26,40%, 22,10%, 22,10% e 26,85% respectivamente, comparado aos grupos HC+7S<sup>1</sup>; HC+7S<sup>2</sup>; HC+FF e HC+7S<sup>2</sup>+FF, oposto encontrado por Chen et al. (2003), Fukui et al. (2002), Kern et al. (2002) e Aoyama et al. (2000). Somente os resultados de Rho et al. (2007), mostraram que a excreção do grupo hipercolesterolêmico confrontado aos grupos alimentados com peptídeo BSP, 2% e 6% da caloria total da dieta, teve um aumento, respectivamente, de 61,74 e 86,00%, resultados estes similares aos encontrados neste estudo.

Os dados observados a partir da administração da dose de 30mg/kg/dia de fenofibrato nos grupos HC+FF e HC+7S<sup>2</sup>+FF, comparados aos grupos HC+7S<sup>1</sup> e HC+7S<sup>2</sup>, permitem sugerir que o consumo e a excreta fecal não apresentam relações com a ação do medicamento. Estes resultados confirmam os apresentados por Ferreira et al. (2008) e Sotomayor et al. (2007), que não observaram alterações no consumo alimentar em ratos tratados com 100mg/kg/dia de fenofibrato. Metais et al. (2008) mencionam o acréscimo da ingestão na 7<sup>a</sup> semana de tratamento com 100mg/kg/dia.

Tabela 5. Peso corpóreo, ingestão, excreção fecal e eficácia alimentar (EA) dos grupos experimentais após 28 dias.

VARIÁVEIS	GRUPOS EXPERIMENTAIS <sup>‡</sup>												
	STD		HC		HC + 7S <sup>1</sup>		HC + 7S <sup>2</sup>		HC+FF		HC+7S <sup>2</sup> +FF		ANOVA
	MÉDIA	SEM	MÉDIA	SEM	MÉDIA	SEM	MÉDIA	SEM	MÉDIA	SEM	MÉDIA	SEM	P ≤
<b>Peso Inicial (g)</b>	195,23	5,03	196,55	4,63	191,12	4,79	195,26	3,64	193,26	3,64	193,18	3,62	0,961
<b>Peso Final (g)</b>	287,77	7,07	295,01	5,43	287,61	5,75	300,64	7,71	281,14	4,25	306,64	7,71	0,088
<b>Ganho de peso (g/dia)</b>	3,31	0,24	3,51	0,32	3,44	0,22	3,76	0,29	3,86	0,29	3,14	0,17	0,065
<b>Consumo alimentar (g/dia)</b>	15,47	0,27	16,74	0,33	16,22	0,32	16,25	0,22	15,35	0,22	15,61	0,30	0,069
<b>Excreção (g/dia)</b>	2,61 <sup>c</sup>	0,08	3,59 <sup>a</sup>	0,12	2,84 <sup>b</sup>	0,09	2,94 <sup>b</sup>	0,09	2,94 <sup>b</sup>	0,09	2,83 <sup>b</sup>	0,09	0,001
<b>CEA</b>	21,36	1,67	21,01	1,44	21,24	1,26	23,05	1,93	23,21	1,93	20,90	1,51	0,091

<sup>‡</sup>Valores representados em média ± SEM. Médias com letras distintas comparadas entre colunas apresentam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Student-Newman-Keuls. STD = Padrão; HC = Hipercolesterolêmico; HC+7S<sup>1</sup> =  $\beta$ -conglícinina 200mg/kg/dia; HC+7S<sup>2</sup> =  $\beta$ -conglícinina 300mg/kg/dia; HC+FF = Fenofibrato 30mg/kg/dia e HC+7S<sup>2</sup>+FF =  $\beta$ -conglícinina 200 e fenofibrato 30mg/kg/dia.

### 5.5. Peso relativo dos órgãos e índices hepato e víscero-somáticos

Os resultados descritos na tabela 6 mostram que peso relativo do fígado dos animais alimentados com 1% de colesterol e 0,5% de ácido cólico (dieta HC) foi significativamente maior ( $P < 0,01$ ), comparado ao padrão (STD). Para o grupo HC, este aumento representou 24,22%, efeito semelhante ao reportado por Sirtoti et al. (1984), em ratos alimentados com dieta suplementada com 1,2% de colesterol.

A administração da proteína  $\beta$ -conglucina nos grupos HC+7S<sup>1</sup> e HC+7S<sup>2</sup> não promoveu redução deste efeito, que foi ratificado pelo índice hepato-somático (Figura 10). Resultado similar foi observado Chen et al. (2003), utilizando ratos alimentados com a fração não-hidrolisada do isolado protéico de soja, e Aoyama et al. (2000), em camungongos geneticamente obesos e alimentados com isolado e hidrolisados de proteína de soja. Por outro lado, Aoyama et al. (2001) reportaram, em ratos alimentados com isolado protéico ou  $\beta$ -conglucina, redução do peso hepático de 15,85 e 21,14%, respectivamente. Esse comportamento foi observado inicialmente por Sirtori et al. (1984), em ratos que tiveram redução de 13,44% do peso, quando alimentados com proteína de soja e comparando-se ao grupo caseína.

No entanto, a dose de 30mg/kg/dia do fenofibrato promoveu um aumento significativo ( $P < 0,001$ ) do peso hepático nos grupos HC+FF e HC+7S<sup>2</sup>FF, iguais a 93,57% e 77,25%, respectivamente, quando comparados ao STD, e 55,83% e 42,69%, respectivamente, em relação ao HC. O grupo HC+7S<sup>2</sup>FF teve efeito de 23,54% menor comparado ao HC+FF ( $P < 0,01$ ), indicando que a  $\beta$ -conglucina minimizou os efeitos produzido pelo fenofibrato (Figura 10). Yamamoto et al. (1996) mostraram, em ratos que consumiram, durante nove dias, dieta suplementada com 0,05% de fenofibrato, um aumento de 42,59% do peso hepático. Dado semelhante

foi reportado também por Mancini et al. (2001), em ratos tratados por 60 dias, em que o acréscimo foi de 35,29%.

No entanto, o peso relativo do tecido adiposo, índice víscero-somático, do coração e a relação coração / peso corpóreo não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais padrão (STD), hipercolesterolêmico (HC), tratados com proteína (HC+7S<sup>1</sup> e HC+7S<sup>2</sup>) e fenofibrato (HC+FF; HC+7S<sup>2</sup>+FF) (Tabela 6). Estes resultados foram semelhantes aos reportados por Aoyama et al. (2000) e Kern et al. (2002), em ratos *Sprague-Dawley* alimentados com dietas com isolado ou hidrolisado de soja como fonte protéica, corroborando posteriormente (Aoyama et al., 2001) em ratos adultos *Wistar* alimentados com isolado protéico e mesmo com a proteína  $\beta$ -conglícinina. Por outro lado, Rho et al. (2007), em ratos *Sprague-Dawley* tratados com BSP (black soy peptide), apresentaram redução do tecido adiposo em 12,23%, 19,68% e 26,06%, respectivamente, para os animais alimentados com o peptídeo BSP em 2%, 6% e 10% da caloria total da dieta. Moriyama et al. (2004), em camundongo normal (ICR) e geneticamente modificado (KK-A<sup>Y</sup>), observaram redução não significativa da deposição de gordura nos animais tratados com as proteínas  $\beta$ -conglícinina ou glicínina da soja.

Embora não tenha sido observada redução significativa do tecido adiposo neste experimento, o índice víscero-somático (Figura 11) mostrou diminuição de 6,88% e 13,23%, respectivamente, para os grupos HC+FF e HC+7S<sup>2</sup>+FF, que receberam o fenofibrato. A ação do medicamento pode ter sido responsável pelo observado, já que nos grupos HC+7S e HC+7S<sup>2</sup> nada foi alterado.

Tabela 6. Peso relativo dos órgãos, tecido adiposo e índices hepato (IHS), víscero (IVS)-somáticos, dos grupos experimentais após 28 dias

VARIÁVEIS	GRUPOS EXPERIMENTAIS <sup>‡</sup>												ANOVA P ≤
	STD		HC		HC + 7S <sup>1</sup>		HC + 7S <sup>2</sup>		HC+FF		HC+7S <sup>2</sup> +FF		
	MÉDIA	SEM	MÉDIA	SEM	MÉDIA	SEM	MÉDIA	SEM	MÉDIA	SEM	MÉDIA	SEM	
<b>Fígado (g)</b>	10,90 <sup>d</sup>	0,45	13,54 <sup>c</sup>	0,36	12,61 <sup>c</sup>	0,41	13,55 <sup>c</sup>	0,87	21,10 <sup>a</sup>	0,69	19,32 <sup>b</sup>	0,38	0,001
<b>IHS (%)</b>	3,79 <sup>d</sup>	0,12	4,59 <sup>c</sup>	0,14	4,38 <sup>c</sup>	0,10	4,41 <sup>c</sup>	0,20	7,51 <sup>a</sup>	0,27	6,30 <sup>b</sup>	0,12	0,001
<b>Tecido adiposo (g)</b>	5,05	0,36	5,54	0,23	5,22	0,44	5,39	0,46	4,97	0,24	5,02	0,28	0,521
<b>IVS (%)</b>	1,75	0,11	1,89	0,10	1,81	0,15	1,79	0,13	1,76	0,09	1,64	0,11	0,032
<b>Coração (g)</b>	1,088	0,04	1,032	0,04	0,998	0,03	0,944	0,03	0,957	0,03	0,957	0,02	0,085
<b>Coração / Peso (g)</b>	0,379	0,01	0,349	0,01	0,347	0,01	0,309	0,02	0,341	0,01	0,331	0,01	0,070

<sup>‡</sup>Valores representados em média ± SEM. Médias com letras distintas comparadas entre colunas apresentam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Student-Newman-Keuls. STD = Padrão; HC = Hipercolesterolêmico; HC+7S<sup>1</sup> =  $\beta$ -conglícinina 200mg/Kg/dia; HC+7S<sup>2</sup> =  $\beta$ -conglícinina 300mg/Kg/dia; HC+FF = Fenofibrato 30mg/Kg/dia e HC+7S<sup>2</sup>+FF =  $\beta$ -conglícinina 200 e fenofibrato 30mg/Kg/dia.

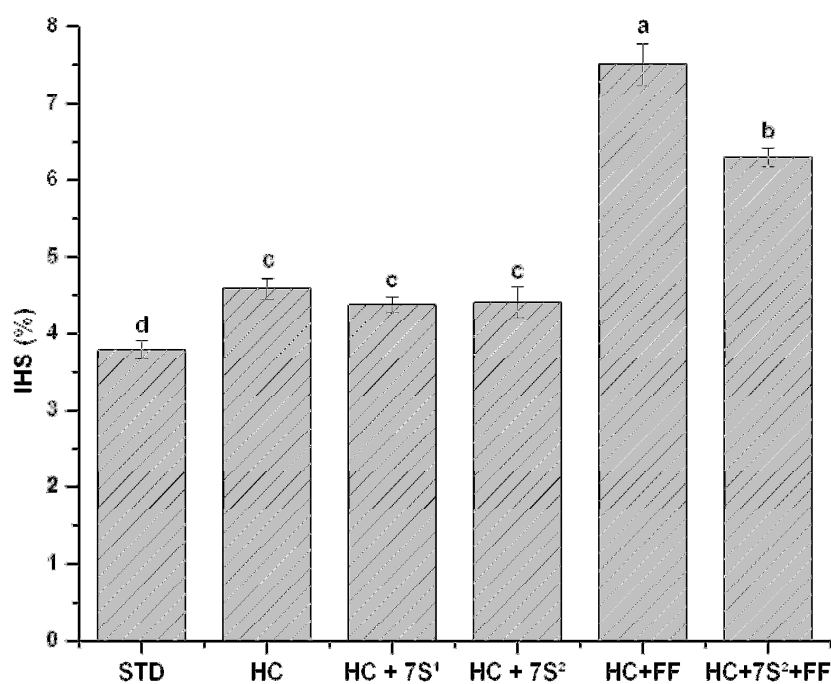


Figura 10. Comparação entre os índices hepato-somático (IHS) dos grupos experimentais. \*Valores representados em média  $\pm$  SEM. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas apresentam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ).

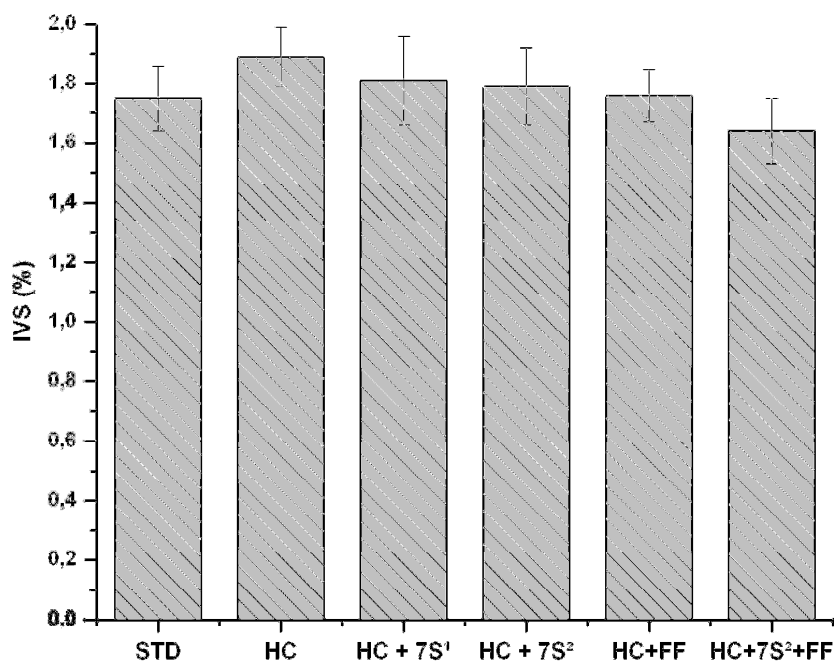


Figura 11. Comparação entre os índices víscero-somático (IVS) dos grupos experimentais. \*Valores representados em média  $\pm$  SEM. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas apresentam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ). STD = Padrão; HC = Hipercolesterolêmico; HC+7S<sup>1</sup> =  $\beta$ -conglícinina 200mg/Kg/dia; HC+7S<sup>2</sup> =  $\beta$ -conglícinina 300mg/Kg/dia; HC+FF = Fenofibrato 30mg/Kg/dia e HC+7S<sup>2</sup>+FF =  $\beta$ -conglícinina 200 e fenofibrato 30mg/kg/dia.

### 5.6. Lipídios e lipoproteínas plasmáticas

Na figura 12 encontra-se o resultado da concentração sérica do colesterol total nos grupos com dieta STD ou HC, tratados com a proteína  $\beta$ -conglucina ou fenofibrato.

O colesterol total sérico foi significativamente maior nos grupos que receberam a dieta HC, enriquecida com 1% de colesterol e 0,5% de ácido cólico, durante os 28 dias. Entretanto, a administração, em diferentes concentrações da proteína  $\beta$ -conglucina, promoveu uma atenuação da ação provocada pela dieta HC. Os resultados mostram que a  $\beta$ -conglucina provocou uma diminuição significativa do nível plasmático de colesterol total nos grupos HC+7S<sup>1</sup> ( $P < 0,05$ ) e HC+7S<sup>2</sup> ( $P < 0,01$ ), quando comparados ao grupo HC. O HC+7S<sup>2</sup> teve uma redução superior quando comparado ao HC+7S<sup>1</sup> ( $P < 0,05$ ). Os grupos HC+FF e HC+7S<sup>2</sup>+FF tratados com o fenofibrato apresentam redução mais intensa e significativa ( $P < 0,001$ ).

O resultado do colesterol total, em relação aos diferentes tratamentos, mostra que o HC ( $3,88 \pm 0,22$  mmol/L) apresentou um aumento de 142,50% em relação ao STD ( $1,60 \pm 0,05$  mmol/L) após os 28 dias experimentais ( $P < 0,001$ ). Resultados semelhantes aos reportados por Fukui et al. (2002), e Zhong et al. (2007), em ratos com dieta suplementada com 1% de colesterol e 10% de gordura de porco, que durante apenas 10 dias provocou aumento de 100,89%.

A administração da  $\beta$ -conglucina provocou uma diminuição de 11% e 23% respectivamente, nos grupos HC+7S<sup>1</sup> ( $3,45 \pm 0,11$  mmol/L) e HC+7S<sup>2</sup> ( $2,99 \pm 0,10$  mmol/L), quando comparados ao HC. É importante ressaltar que o HC+7S<sup>2</sup> mostrou redução de 13,5% superior ao HC+7S<sup>1</sup>. A administração de fenofibrato em associação ou não com a  $\beta$ -conglucina, acarretou redução, comparativamente ao grupo hipercolesterolêmico. Deste modo, os grupos HC+FF ( $2,49 \pm 0,15$  mmol/L) e

HC+7S<sup>2</sup>+FF (2,33 ± 0,22 mmol/L) apresentaram redução, respectivamente, de 35,82% e 39,95. Por outro lado, no grupo HC+7S<sup>2</sup>+FF, em que os animais foram tratados com a associação da proteína-medicamento, não houve uma redução significativa em relação ao grupo HC+FF ( $P > 0,05$ ).

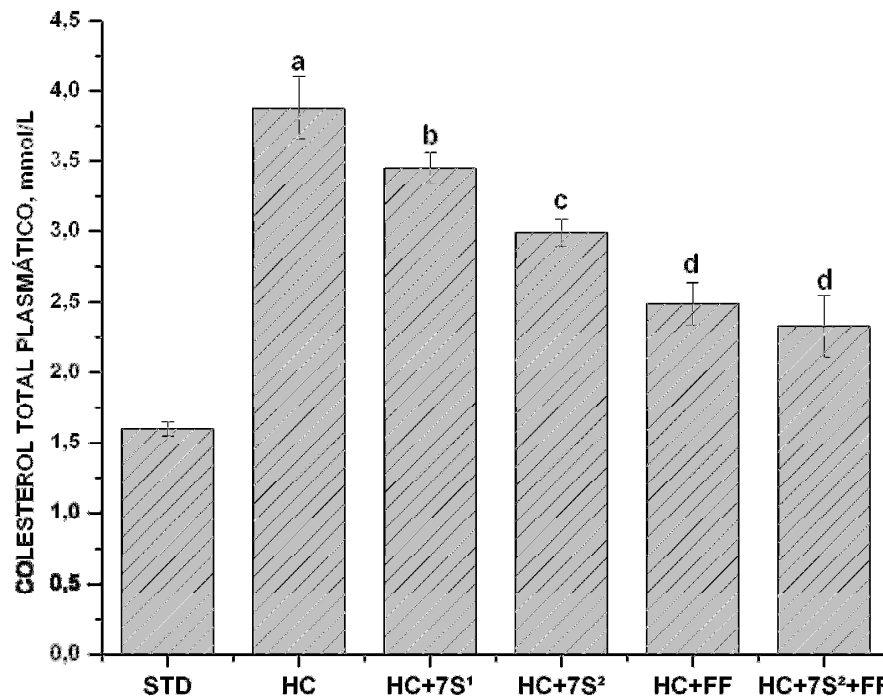


Figura 12. Concentração sérica de colesterol total dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. \*Valores representados em média ± SEM. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas apresentam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ). STD = Padrão; HC = Hipercolesterolêmico; HC+7S<sup>1</sup> =  $\beta$ -conglícinina 200mg/kg/dia; HC+7S<sup>2</sup> =  $\beta$ -conglícinina 300mg/kg/dia; HC+FF = Fenofibrato 30mg/kg/dia e HC+7S<sup>2</sup>+FF =  $\beta$ -conglícinina 200 e fenofibrato 30mg/kg/dia.

Este efeito observado no colesterol sérico dos animais tratados com a  $\beta$ -conglícinina foi reportado por Aoyama et al. (2000) que obtiveram redução de 29,08% em ratos alimentados com isolado de soja hidrolisado. Fukui et al. (2002) verificaram diminuição de 20,57%, em ratos *Sprague-Dawley* alimentados com dietas à base de isolado protéico de soja ausente de compostos de isoflavona. Chen et al. (2003) apontou uma redução de 29,18% em ratos *Wistar* alimentados com



10% da fração não-hidrolisada obtida de isolado protéico de soja. Recentemente, Duranti et al. (2004) reportaram uma redução de 49% e 36%, respectivamente, em ratos *Sprague-Dawley* tratados com  $\beta$ -conglucina e com a subunidade  $\alpha'$  da  $\beta$ -conglucina. Por outro lado, Adams et al. (2002) observaram redução de 33,91%, somente em camundongos fêmeas ovariectomizadas transgênicos deficientes em receptores de LDL (LDLR  $-/-$ ), com dieta isenta de isoflavona, o que não se observou nos machos. Para ambos os sexos, em camundongos transgênicos deficientes em Apo E (Apo E  $-/-$ ), não foram observadas alterações quando alimentados com proteína isolada de soja isenta ou suplementada com compostos de isoflavona. Moriyama et al. (2004) não obtiveram alteração para este evento em camundongos normais e geneticamente obesos tratados com glicina e  $\beta$ -conglucina.

A ação do fenofibrato observada neste experimento foi igualmente reportada por Tsutsumi et al. (2001) que, em ratos *Wistar* com peso inicial entre 160 e 190g, e tratados durante 28 dias com concentrações de 5 e 30mg/kg/dia do fenofibrato, observaram redução de 14,07% e 37,11%, respectivamente, do colesterol sérico. Ferreira et al. (2008) e Sotomayor et al. (2007) observaram redução de 45,88% e 43,71%, respectivamente, em ratos *Wistar*, quando tratados com dose de 100mg/kg/dia.

A figura 13 mostra o resultado da concentração sérica de triglicérides nos grupos com dieta STD ou HC, tratados com a proteína  $\beta$ -conglucina ou fenofibrato. Como observado com o colesterol, a concentração de triglicérides séricos foi aumentada significativamente, comparada ao grupo padrão ( $P < 0,001$ ), após os 28 dias alimentados com a dieta HC. Entretanto, a administração em diferentes concentrações da  $\beta$ -conglucina promoveu uma redução significativa nos níveis de triglicérides dos grupos HC+7S<sup>1</sup> ( $P < 0,05$ ) e HC+7S<sup>2</sup> ( $P < 0,01$ ), observada

também nos grupos HC+FF ( $P < 0,001$ ) e HC+7S<sup>2</sup>+FF ( $P < 0,001$ ). O grupo HC+7S<sup>2</sup> apresentou uma redução mais próxima ao HC+FF ( $P < 0,05$ ) que o grupo HC+7S<sup>1</sup>. As concentrações plasmáticas de triglicérides dos grupos tratados com  $\beta$ -conglucina apresentaram valores 25% e 34,78% menores, respectivamente, para o HC+7S<sup>1</sup> ( $0,69 \pm 0,05$  mmol/L) e HC+7S<sup>2</sup> ( $0,60 \pm 0,04$  mmol/L), em relação ao HC ( $0,92 \pm 0,05$  mmol/L). Por outro lado, o HC+7S<sup>2</sup> apresentou redução de 9,78% maior que o HC+7S<sup>1</sup>. Os grupos HC+FF ( $0,50 \pm 0,02$  mmol/L) e HC+7S<sup>2</sup>+FF ( $0,49 \pm 0,03$  mmol/L) mostraram diminuição de 45,65 e 46,74%, respectivamente, comparados ao HC.

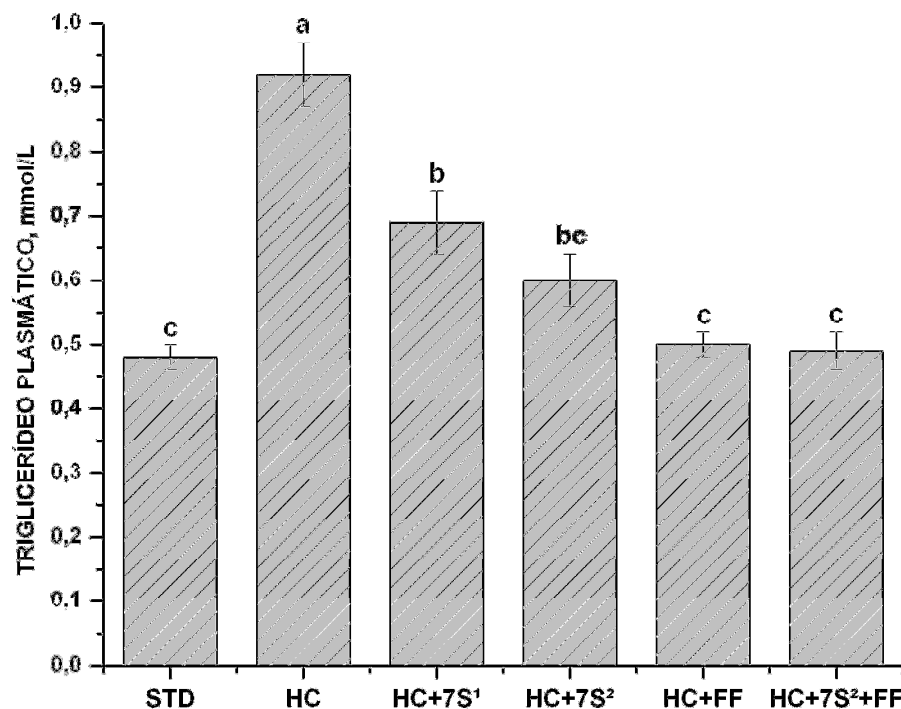


Figura 13. Concentração sérica de triglicéride dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. \*Valores representados em média  $\pm$  SEM. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas apresentam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ). STD = Padrão; HC = Hipercolesterolêmico; HC+7S<sup>1</sup> =  $\beta$ -conglucina 200mg/kg/dia; HC+7S<sup>2</sup> =  $\beta$ -conglucina 300mg/kg/dia; HC+FF = Fenofibrato 30mg/kg/dia e HC+7S<sup>2</sup>+FF =  $\beta$ -conglucina 200 e fenofibrato 30mg/kg/dia.

O efeito da proteína  $\beta$ -conglucina no triglicéride, evidenciado em nosso estudo, foram distintos dos descritos por Aoyama et al. (2000), em ratos *Sprague-*

*Dawley*, que apresentaram redução não significativa de 24,81% e 33,33%, respectivamente, para isolado protéico e seu hidrolisado, comparado ao controle caseína. O mesmo foi evidenciado por Fukui et al. (2002), em ratos da mesma linhagem, alimentados com isolado protéico suplementado ou não com compostos de isoflavona. Por outro lado, resultados similares aos nossos foram reportados por Aoyama et al. (2001), que observaram, em ratos adultos *Wistar*, diminuição de 38,98% com isolado protéico de soja e 58,31% com a  $\beta$ -conglucina. Fukui et al. (2004) mostraram redução de 41,30% nos triglicérides séricos em ratos *Wistar* tratados por 10 dias com  $\beta$ -conglucina. Duranti et al. (2004), em ratos *Sprague-Dawley* tratados com  $\beta$ -conglucina ou com a subunidade  $\alpha'$  da  $\beta$ -conglucina, evidenciaram uma redução do triglicérideo sérico em 34% e 50%, respectivamente. Zhong et al. (2007) reportaram, em camundongos tratados durante 30 dias com peptídeo obtido da hidrólise da proteína de soja (SAPH), uma redução de 18,38%, 11,76% e 19,85%, respectivamente, quando tratados com dose de 0,1g, 0,5g e 2,5g SAPH/kg.

Os grupos tratados com fenofibrato apresentaram redução significativa da concentração dos triglicérides séricos, semelhante aos resultados evidenciados por Ferreira et al. (2006), que mostraram uma redução de 59,06% em ratos *Wistar* alimentados com dieta normal e tratados por nove dias com 100mg/kg/dia de fenofibrato. Posteriormente, corroborado por Ferreira et al. (2008), em estudo com uma dieta suplementada com 1% de ácido orótico, que nas mesmas condições anteriores mostrou diminuição de 65,26%, quando comparado ao controle. Sotomayor et al. (2007), em ratos *Wistar* com dieta normal e administrando 100mg/kg/dia de fenofibrato, durante 8 semanas, observaram redução de 36,36%

dos triglicerídeos. Isso foi também reportado por Metais et al. (2008), que notaram uma diminuição de 44,18% em ratos *Zucker* diabéticos.

Na figura 14 e 15 encontram-se os resultados das concentrações séricas da fração HDL-C e não-HDL-C, nos grupos com dieta STD ou HC, tratados com a proteína  $\beta$ -conglucina ou fenofibrato. A dieta hipercolesterolêmica (HC) provocou redução significativa ( $P < 0,05$ ) da concentração sérica da lipoproteína HDL no grupo HC ( $0,45 \pm 0,02$  mmol/L), comparado ao grupo padrão ( $0,79 \pm 0,03$  mmol/L). Por outro lado, a administração da proteína  $\beta$ -conglucina mostrou minimizar este efeito, como observado nos grupos HC+7S<sup>1</sup> ( $P > 0,05$ ) e HC+7S<sup>2</sup> ( $P < 0,05$ ), que apresentaram valores aumentados desta lipoproteína em relação à sua concentração do HC. No entanto, este efeito foi percentualmente inferior ao observado nos animais tratados com o fenofibrato. Os grupos HC+FF ( $P < 0,01$ ) e HC+7S<sup>2</sup>+FF ( $P < 0,001$ ) mostraram aumento mais significativo neste parâmetro em relação ao HC. A concentração do HDL-C indicou aumento de 32,81% e 56,85%, respectivamente, para os grupos HC+7S<sup>1</sup> ( $0,59 \pm 0,02$  mmol/L) e HC+7S<sup>2</sup> ( $0,70 \pm 0,05$  mmol/L), em relação ao grupo HC, e o grupo HC+7S<sup>2</sup> apresentou valor 24,04% maior que o HC+7S<sup>1</sup>. No HC+FF ( $0,88 \pm 0,13$  mmol/L) e HC+7S<sup>2</sup>+FF ( $0,93 \pm 0,10$  mmol/L) este acréscimo foi de 97,98% e 109,66%, respectivamente.

Por outro lado, a concentração plasmática da fração não-HDL-C (VLDL-C + LDL-C), que se mostrou expressivamente aumentada no grupo HC ( $P < 0,001$ ) em relação ao STD ( $0,81 \pm 0,08$  mmol/L), foi significativamente menor nos grupos HC+7S<sup>1</sup> ( $P < 0,05$ ) e HC+7S<sup>2</sup> ( $P < 0,01$ ), tratados com  $\beta$ -conglucina, e no HC+FF ( $P < 0,001$ ) e HC+7S<sup>2</sup>+FF ( $P < 0,001$ ), que receberam o fenofibrato. A fração não-HDL-C mostrou-se 16,62% ( $2,86 \pm 0,14$  mmol/L) e 33,24% ( $2,29 \pm 0,10$  mmol/L) menor, respectivamente, para os grupos HC+7S<sup>1</sup> e HC+7S<sup>2</sup>, se comparados ao HC

(3,43 mmol/L). O HC+7S<sup>2</sup> apresentou uma redução 16,62% superior ao HC+7S<sup>1</sup>. No grupo HC+FF (1,61 ± 0,06 mmol/L) e HC+7S<sup>2</sup>+FF (1,39 ± 0,12 mmol/L), este decréscimo foi de 53,06% e 59,48%, respectivamente.

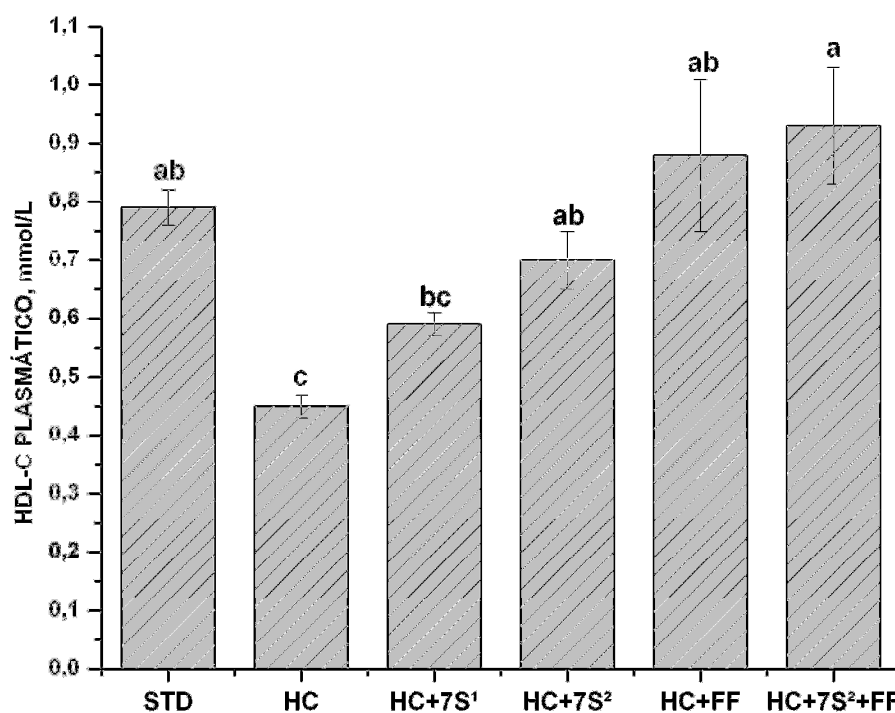


Figura 14. Concentração sérica da lipoproteína HDL-C dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. \*Valores representados em média ± SEM. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas apresentam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ). STD = Padrão; HC = Hipercolesterolêmico; HC+7S<sup>1</sup> =  $\beta$ -conglícinina 200mg/kg/dia; HC+7S<sup>2</sup> =  $\beta$ -conglícinina 300mg/kg/dia; HC+FF = Fenofibrato 30mg/kg/dia e HC+7S<sup>2</sup>+FF =  $\beta$ -conglícinina 200 e fenofibrato 30mg/kg/dia.

Os resultados mostrados neste estudo para HDL-C e não-HDL-C foram semelhantes aos reportados por Dabai et al. (1996) que verificaram que algumas espécies de leguminosas — *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus lunatus* e a *Vigna subterrânea* — elevaram o HDL-C em 41,84%, 40,82% e 68,37%, em ratos *Wistar* alimentados com dieta hipercolesterolêmica com 1% de colesterol e 0,5% de ácido cólico.

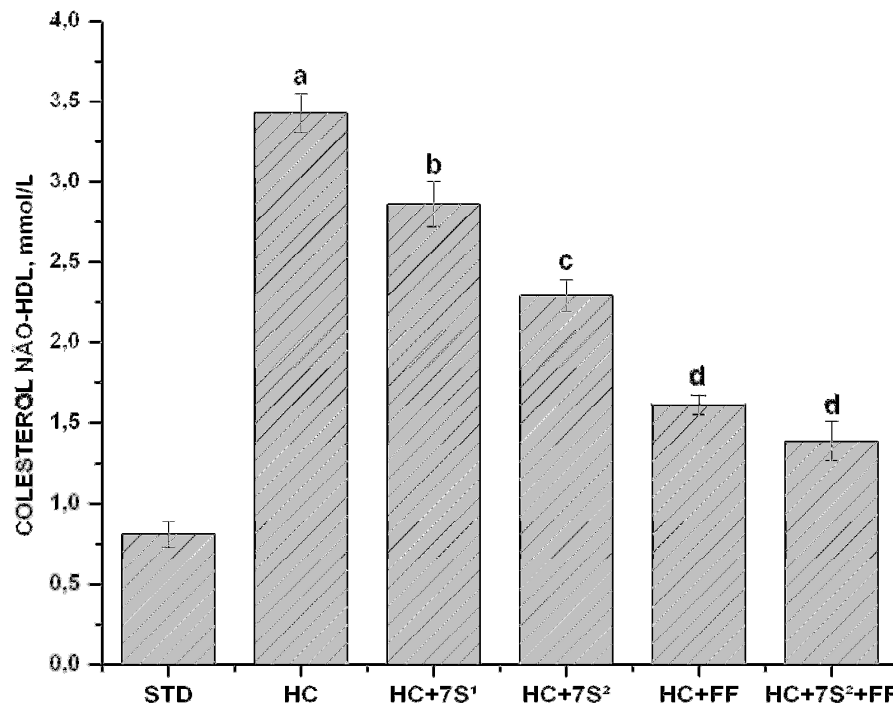


Figura 15. Concentração sérica da fração não-HDL (VLDL-C + LDL-C) dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. \*Valores representados em média  $\pm$  SEM. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas apresentam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ). STD = Padrão; HC = Hipercolesterolêmico; HC+7S<sup>1</sup> =  $\beta$ -conglucina 200mg/kg/dia; HC+7S<sup>2</sup> =  $\beta$ -conglucina 300mg/kg/dia; HC+FF = Fenofibrato 30mg/kg/dia e HC+7S<sup>2</sup>+FF =  $\beta$ -conglucina 200 e fenofibrato 30mg/kg/dia.

Rho et al. (2007), em ratos *Sprague–Dawley* tratados com BSP (black soy peptide), mostraram aumento do HDL-C em 29,28%, 41,00% e 122,62%, e redução da fração não-HDL-C em 13,84%, 24,44% e 54,28%, respectivamente, para BSP em 2%, 6% e 10% do valor calórico da dieta. Kern et al. (2002) observaram acréscimo não significativo da HDL-C, porém, houve redução de 38,32% na fração não-HDL-C em ratos *Sprague-Dawley* alimentados com isolado protéico de soja. Choi et al. (2005) reportaram aumento na HDL-C de 105,26% e 66,67%, respectivamente, em camundongos diabéticos geneticamente modificados (KK-A<sup>y</sup>), com dieta normal e hiperlipídica, ambos alimentados com proteína isolada de um grão de milho (*Panicum miliaceum* L). Resultados contrários foram observados por Aoyama et al.

(2000), em ratos *Sprague–Dawley* alimentados com isolado protéico, em que não ocorreu alteração da HDL-C. Posteriormente, no entanto, Aoyama et al. (2001) mostrou que o isolado protéico e a  $\beta$ -conglícinina da soja provocavam redução em ratos *Wistar*, comparados à caseína, em grupos alimentados com o hidrolisado protéico. Por outro lado, Wilson et al. (2007) observaram um aumento significativo, na 2ª semana, de 17,11% da HDL-C; no entanto, a fração não-HDL-C foi menor em 53,16%, 57,12% e 41,51%, respectivamente, na 2ª, 4ª e 6ª semanas, em *Hamsters* alimentados com proteína isolada de soja isenta de isoflavonas. Zhong et al. (2007) mostraram, em camundongos tratados com peptídeo obtido da hidrólise da proteína de soja (SAPH), uma redução da concentração da fração não-HDL-C de 9,46%, 34,46% e 44,59%, respectivamente, quando tratados com dose de 0,1, 0,5 e 2,5g/SAPH/kg.

As figuras 16 e 17 mostram os respectivos resultados das relações entre colesterol total-HDL-C e do índice aterogênico, nos grupos com dieta STD ou HC, tratados com a proteína  $\beta$ -conglícinina ou fenofibrato.

A razão colesterol total–HDL-C e o índice aterogênico, definido como indicador da pré-disposição da incidência às doenças do coração, no grupo HC ( $8,33 \pm 0,58$  mmol/mmol e  $8,09 \pm 0,07$ ) foram intensamente aumentados, determinando relações negativas comparados ao grupo STD ( $2,02 \pm 0,04$  mmol/mmol e  $1,02 \pm 0,03$ ) ( $P < 0,001$ ), e contrários aos evidenciados nos grupos HC+7S<sup>1</sup> ( $P < 0,001$ ) e HC+7S<sup>2</sup> ( $P < 0,001$ ), que apresentaram valores menores em relação ao grupo HC, sendo observado também para os grupos HC+FF ( $P < 0,001$ ) e HC+7S<sup>2</sup>+FF ( $P < 0,001$ ). Estes resultados indicam que a  $\beta$ -conglícinina tem efeito na modulação das lipoproteínas, que interferem diretamente no índice aterogênico indicador da pré-disposição da incidência das doenças do coração. Uma vez que estes eventos foram

mais evidentes comparados aos dados de colesterol total, pelo fato de se tratar da relação entre duas variáveis relacionadas, que possibilitaram demonstrar que os grupos HC+7S<sup>1</sup> ( $5,90 \pm 0,28$  mmol/mmol e  $4,91 \pm 0,11$ ) e HC+7S<sup>2</sup> ( $4,52 \pm 0,42$  mmol/mmol e  $3,52 \pm 0,11$ ), em relação ao grupo HC apresentaram redução de 29,17%, 39,31% e 45,74%, 56,49%, respectivamente, para cada grupo, no colesterol total/HDL-C e no índice aterogênico. O grupo HC+7S<sup>2</sup> apresentou uma redução de 16,57% e 17,18% maior que o grupo HC+7S<sup>1</sup> para esses parâmetros.

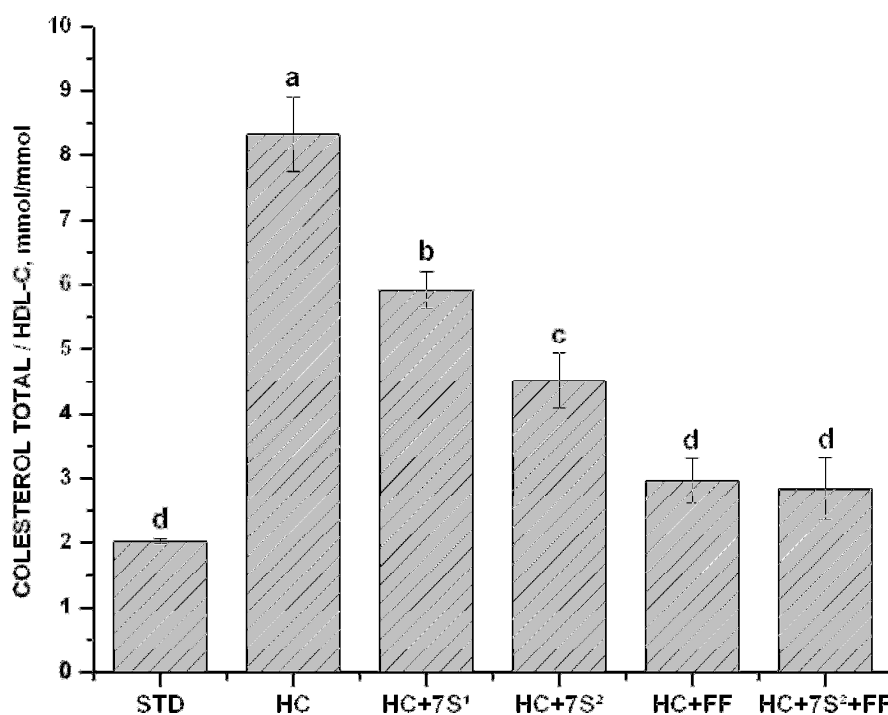


Figura 16. Relação entre colesterol total – HDL-C dos grupos experimentais. \*Valores representados em média  $\pm$  SEM. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas apresentam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ). STD = Padrão; HC = Hipercolesterolemico; HC+7S<sup>1</sup> =  $\beta$ -conglícinina 200mg/kg/dia; HC+7S<sup>2</sup> =  $\beta$ -conglícinina 300mg/kg/dia; HC+FF = Fenofibrato 30mg/kg/dia e HC+7S<sup>2</sup>+FF =  $\beta$ -conglícinina 200 e fenofibrato 30mg/kg/dia.

A atuação do fenofibrato observada na razão colesterol total/HDL-C e índice aterogênico, respectivamente nos grupos HC+FF ( $2,96 \pm 0,34$  mmol/mmol e  $1,96 \pm 0,12$ ) e HC+7S<sup>2</sup>+FF ( $2,84 \pm 0,47$  mmol/mmol e  $1,53 \pm 0,15$ ), mostrou um efeito



superior à  $\beta$ -conglucina, minimizando a ação da dieta (HC) e levando-a próximo aos valores do grupo padrão (STD). A redução observada para colesterol total/HDL-C foi de 64,47% e 65,91%, e no índice aterogênico de 75,77% e 81,09%, respectivamente.

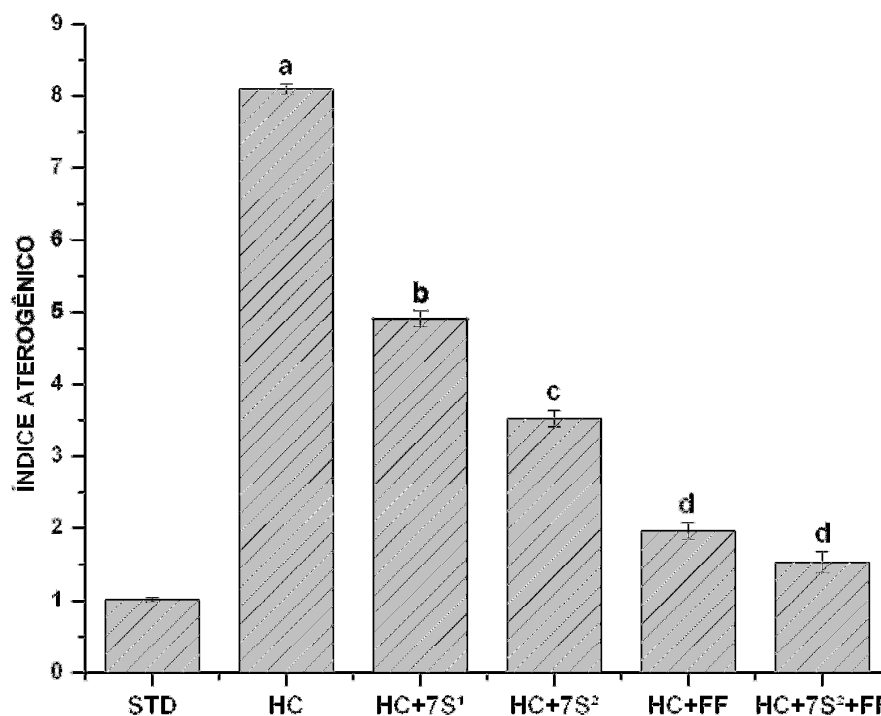


Figura 17. Índice aterogênico dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. \*Valores representados em média  $\pm$  SEM. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas apresentam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ). STD = Padrão; HC = Hipercolesterolêmico; HC+7S<sup>1</sup> =  $\beta$ -conglucina 200mg/kg/dia; HC+7S<sup>2</sup> =  $\beta$ -conglucina 300mg/kg/dia; HC+FF = Fenofibrato 30mg/kg/dia e HC+7S<sup>2</sup>+FF =  $\beta$ -conglucina 200 e fenofibrato 30mg/kg/dia.

Os efeitos da proteína  $\beta$ -conglucina para estes parâmetros evidenciados em nosso estudo, mostraram-se semelhantes aos reportados por Rho et al. (2007), que observaram redução do índice aterogênico em ratos tratados com BSP (black soy peptide) de 30,78%, 48,88% e 80,04%, respectivamente, para dietas contendo peptídeo BSP em 2%, 6% e 10% do valor calórico da dieta. Song et al. (2003) mostraram, em *Hamsters* machos, uma redução de 28,04% e 16,82%, e em fêmeas de 55,69% e 41,12%, respectivamente, quando alimentados com isolado protéico de

soja isento ou suplementado com daidzeína. Kern et al. (2002) evidenciaram uma diminuição de 22,91% e 40,95%, respectivamente, em ratos alimentados com isolado protéico de soja. Por outro lado, Aoyama et al. (2000; 2001), em ratos tratados com isolado protéico hidrolisado ou não, e posteriormente com a  $\beta$ -conglucina, não observaram redução do índice aterogênico, quando comparado ao grupo caseína.

A análise de correlação mostrou uma significativa ( $P < 0,01$ ) dependência entre as seguintes variáveis: colesterol total e colesterol não-HDL (Figura 18) com  $r^2 = 0,941$ ,  $r = 0,914$  (Pearson); colesterol total e índice aterogênico (AI) (Figura 19) com  $r^2 = 0,739$ ,  $r = 0,820$  (Pearson); e colesterol HDL e AI (Figura 20), com  $r^2 = 0,522$ ,  $r = -0,513$  (Pearson).

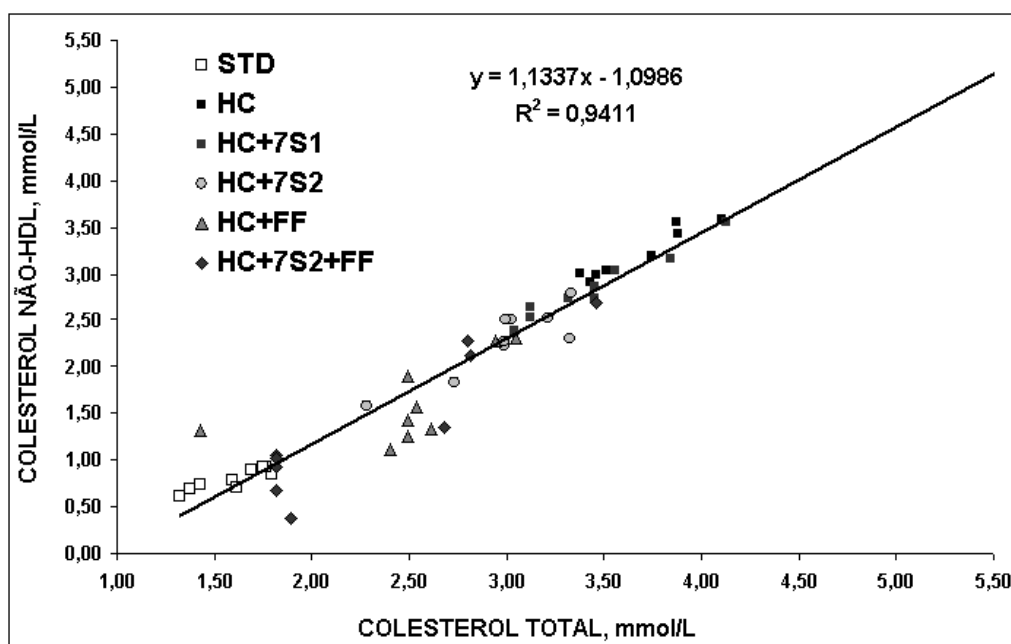


Figura 18. Correlação entre colesterol total e colesterol não-HDL sérico, dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. STD = Padrão; HC = Hipercolesterolemico; HC+7S<sup>1</sup> =  $\beta$ -conglucina 200mg/kg/dia; HC+7S<sup>2</sup> =  $\beta$ -conglucina 300mg/kg/dia; HC+FF = Fenofibrato 30mg/kg/dia e HC+7S<sup>2</sup>+FF =  $\beta$ -conglucina 200 e fenofibrato 30mg/kg/dia.

A dieta hipercolesterolêmica (HC) mostrou aumentar significativamente o colesterol total sérico (Figura 12), sendo que este parâmetro apresentou relação direta com acréscimo da fração não-HDL-C e do AI, o que confirma analogia positiva para a dislipidemia.

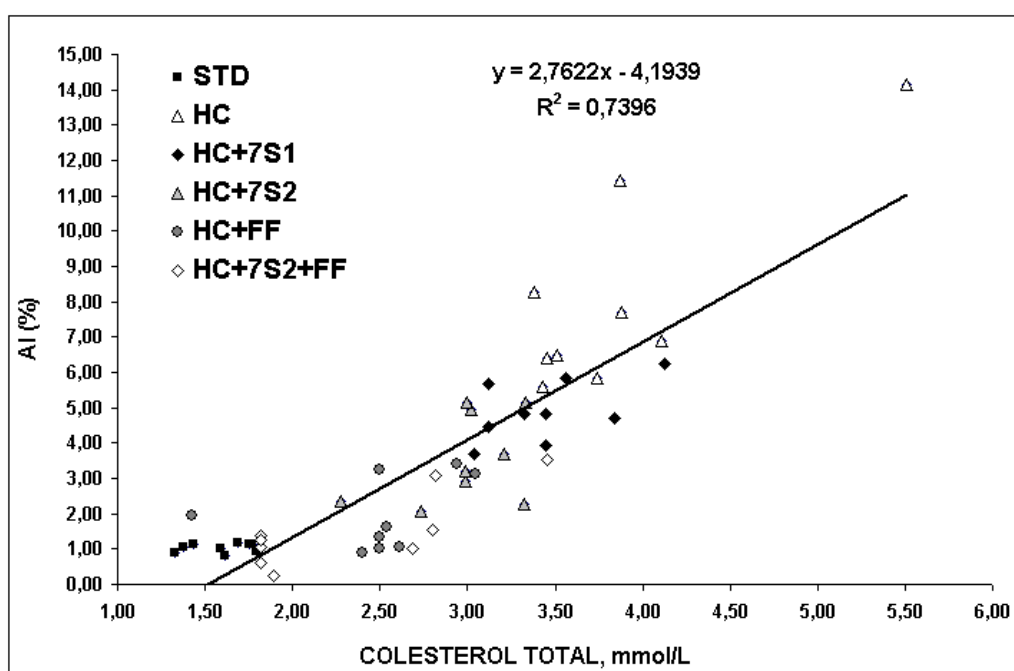


Figura 19. Correlação entre colesterol total sérico e índice aterogênico, dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. STD = Padrão; HC = Hipercolesterolêmico; HC+7S<sup>1</sup> =  $\beta$ -conglucina 200mg/kg/dia; HC+7S<sup>2</sup> =  $\beta$ -conglucina 300mg/kg/dia; HC+FF = Fenofibrato 30mg/kg/dia e HC+7S<sup>2</sup>+FF =  $\beta$ -conglucina 200 e fenofibrato 30mg/kg/dia.

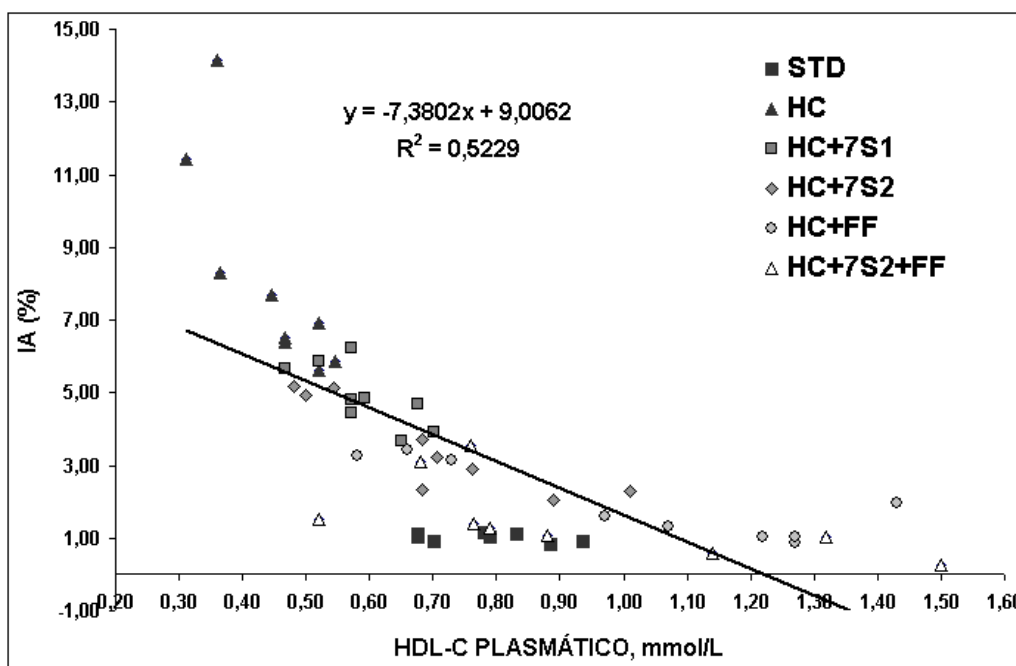


Figura 20. Correlação entre colesterol HDL sérico e índice aterogênico, dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. STD = Padrão; HC = Hipercolesterolêmico; HC+7S<sup>1</sup> =  $\beta$ -conglícinina 200mg/kg/dia; HC+7S<sup>2</sup> =  $\beta$ -conglícinina 300mg/kg/dia; HC+FF = Fenofibrato 30mg/kg/dia e HC+7S<sup>2</sup>+FF =  $\beta$ -conglícinina 200 e fenofibrato 30mg/kg/dia.

A fração HDL-C, reduzida pela ação da dieta HC (Figura 14), mostrou uma relação negativa com índice aterogênico. Estes resultados confirmam que o aumento do HDL-C possui uma relação negativa, enquanto o colesterol total e o não HDL-C, nos ratos alimentados com a dieta HC, esteve diretamente relacionada com o aumento da pré-disposição aterogênica. Por outro lado, a administração da proteína  $\beta$ -conglícinina mostrou alterar este quadro.

### 5.7. Lipídios hepáticos

A figura 18 mostra o resultado da determinação do colesterol total hepático nos grupos com dieta STD ou HC, tratados com a proteína  $\beta$ -conglícinina ou fenofibrato. O colesterol total hepático foi significativamente maior ( $P < 0,001$ ) nos grupos que receberam a dieta HC ( $58,44 \pm 0,85 \mu\text{mol/g}$ ), enriquecida com 1% de

colesterol e 0,5% de ácido cólico durante os 28 dias, comparado ao grupo STD ( $7,1 \pm 0,33 \mu\text{mol/g}$ ). Por outro lado, a administração em diferentes concentrações da proteína  $\beta$ -conglucina promoveu diminuição da ação provocada pela dieta HC. Os resultados mostram que a  $\beta$ -conglucina provocou uma redução significativa do colesterol total hepático nos grupos HC+7S<sup>1</sup> ( $P < 0,01$ ) e HC+7S<sup>2</sup> ( $P < 0,001$ ), quando comparado ao grupo HC, com o HC+7S<sup>2</sup> apresentando redução superior ao HC+7S<sup>1</sup> ( $P < 0,05$ ). Os grupos HC+FF e HC+7S<sup>2</sup>+FF apresentam redução mais intensa e significativa ( $P < 0,001$ ), comparado aos efeitos da proteína. Os grupos que receberam a  $\beta$ -conglucina apresentaram valores de 10,95% e 20,91% menores, respectivamente, para o HC+7S<sup>1</sup> ( $52,04 \pm 0,90 \mu\text{mol/g}$ ) e HC+7S<sup>2</sup> ( $46,22 \pm 0,65 \mu\text{mol/g}$ ) em relação ao HC, com o HC+7S<sup>2</sup> apresentando redução de 9,96% maior que o primeiro. Os grupos HC+FF ( $39,58 \pm 0,85 \mu\text{mol/g}$ ) e HC+7S<sup>2</sup>+FF ( $37,86 \pm 0,80 \mu\text{mol/g}$ ) mostraram diminuição de 32,26% e 35,20%, respectivamente, comparados ao HC.

Chen et al. (2003) observaram redução de 17,59% do colesterol total hepático em ratos alimentados com 10% da fração não-hidrolisada obtida de isolado protéico de soja. Dabai et al. (1996) mostraram, em estudo de comparação entre os efeitos de várias espécies de leguminosas, uma redução 6,45% em ratos alimentados com a proteína isolada do feijão *Phaseolus lunatus*. Sirtori et al. (1984) observaram redução de 95,30% no colesterol esterilificado e 23,53% no livre, em ratos *Sprague–Dawley* alimentados com proteína de soja.

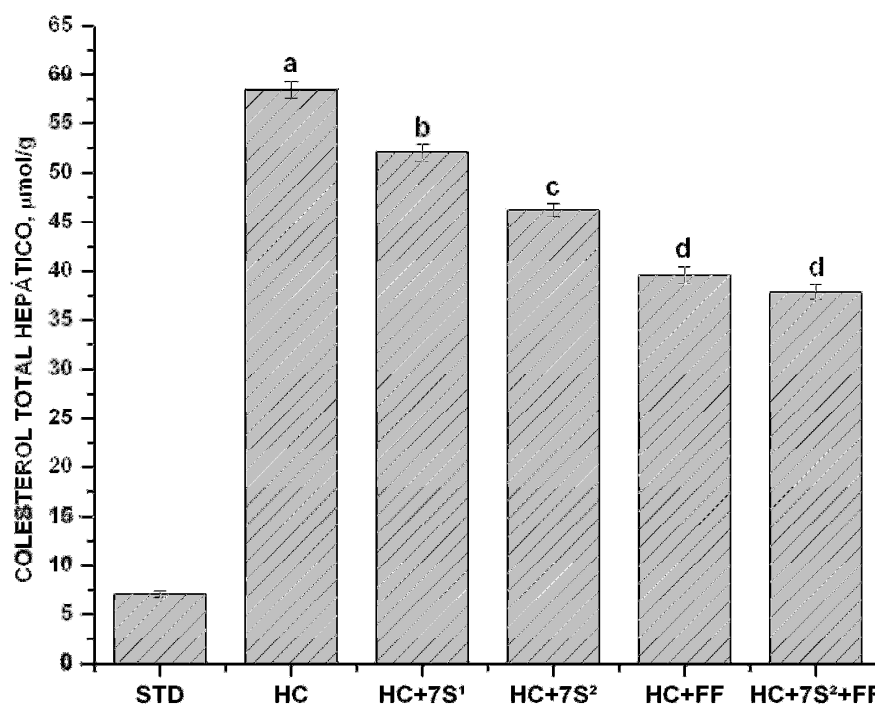


Figura 21. Concentração hepática de colesterol total dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. \*Valores representados em média  $\pm$  SEM. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas apresentam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ). STD = Padrão; HC = Hipercolesterolêmico; HC+7S<sup>1</sup> =  $\beta$ -conglícinina 200mg/kg/dia; HC+7S<sup>2</sup> =  $\beta$ -conglícinina 300mg/kg/dia; HC+FF = Fenofibrato 30mg/kg/dia e HC+7S<sup>2</sup>+FF =  $\beta$ -conglícinina 200 e fenofibrato 30mg/kg/dia.

Gatchalian-Yee et al. (1997), em *hamsters* alimentados com óleo de “perila” 10% e 0,2% de colesterol na dieta, tendo como fonte protéica fração não-digerida da proteína de soja, mostraram redução de 79,37% do colesterol hepático, e de 47,17% no sérico, em relação ao grupo alimentado com isolado protéico de soja. Em um segundo experimento, nas mesmas condições anteriormente citadas, alterando a fonte lipídica para 10% de óleo de girassol e 0,5% de colesterol, observou-se uma diminuição do colesterol hepático e sérico, respectivamente, em 57,71% e 27,39%. Resultado distinto foi reportado por Rho et al. (2007), mostrando, em ratos *Sprague-Dawley* tratados com BSP (black soy peptide), que não ocorreu alterações significativas para este evento. Em estudo Yamamoto et al. (1996), em ratos *Wistar*

com dieta suplementada com 0,05% do fenofibrato, durante nove dias, foi observado um aumento significativo do peso hepático, redução da secreção dos triglicerídeos, porém, sem alteração dos parâmetros ligados ao colesterol.

Na figura 19 encontra-se o resultado da determinação do triglicerídeo hepático, nos grupos com dieta STD ou HC, tratados com a proteína  $\beta$ -conglucina ou fenofibrato. A presença do triglicerídeo no fígado foi significativamente maior nos grupos que receberam a dieta HC. Essa dieta hipercolesterolêmica provocou aumento significativo ( $P < 0,001$ ) no grupo HC ( $56,97 \pm 2,15 \mu\text{mol/g}$ ), comparado ao STD ( $15,60 \pm 0,54 \mu\text{mol/g}$ ). Por outro lado, a administração da proteína  $\beta$ -conglucina mostrou minimizar este efeito, como observado no HC+7S<sup>1</sup> ( $P > 0,05$ ) HC+7S<sup>2</sup> ( $P < 0,05$ ) e HC+FF+7S<sup>2</sup> ( $P < 0,05$ ), que apresentaram quantidades menores em relação ao grupo HC. Contrariamente, este efeito não foi observado no grupo HC+FF ( $P > 0,05$ ) tratados com o fenofibrato, que apresentou resultado semelhante ao reportado para o HC. Os grupos HC+7S<sup>1</sup> ( $52,31 \pm 3,30 \mu\text{mol/g}$ ) HC+7S<sup>2</sup> ( $48,52 \pm 2,8 \mu\text{mol/g}$ ) e HC+FF+7S<sup>2</sup> ( $47,64 \pm 2,38 \mu\text{mol/g}$ ) mostraram redução do triglicerídeo hepático, respectivamente, de 8,18%, 14,83% e 16,38% comparado ao HC. Enquanto, O grupo HC+FF ( $60,06 \pm 1,76 \mu\text{mol/g}$ ) mostrou um aumento não significativo de 5,42% em relação ao HC.

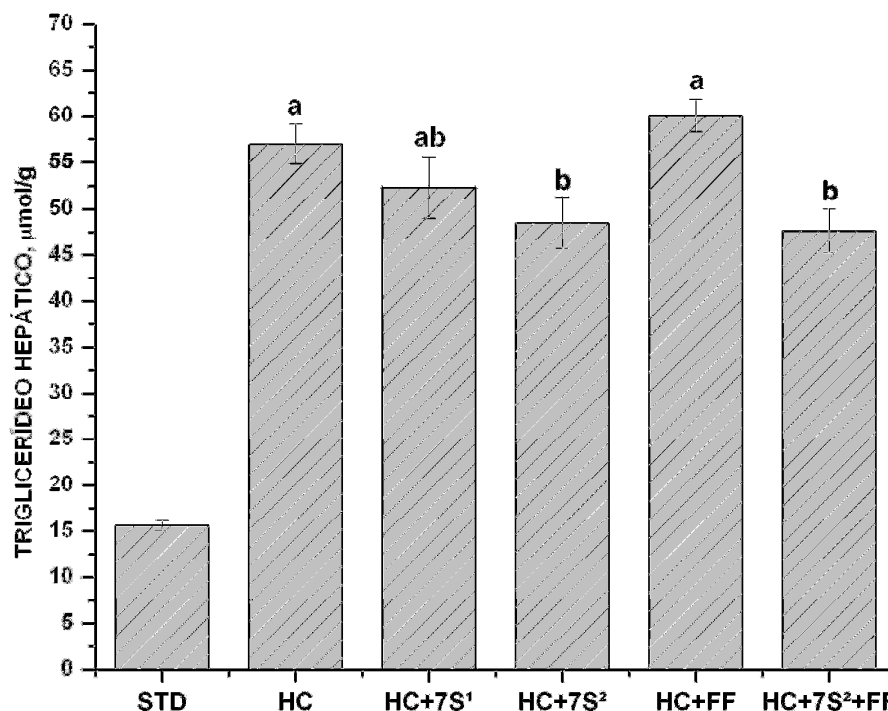


Figura 22. Concentração hepática de triglicerídeo dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. \*Valores representados em média  $\pm$  SEM. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas apresentam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ). STD = Padrão; HC = Hipercolesterolêmico; HC+7S<sup>1</sup> =  $\beta$ -conglícinina 200mg/kg/dia; HC+7S<sup>2</sup> =  $\beta$ -conglícinina 300mg/kg/dia; HC+FF = Fenofibrato 30mg/kg/dia e HC+7S<sup>2</sup>+FF =  $\beta$ -conglícinina 200 e fenofibrato 30mg/kg/dia.

Nossos resultados mostrados para triglicerídeo hepático divergem dos reportados por Gatchalian-Yee et al. (1997), em *hamsters* alimentados com óleo de “perila” 10% e 1,2% de colesterol na dieta, tendo como fonte protéica a fração não-digerida da proteína de soja, que verificaram redução de 53,54% do triglicerídeo hepático, sem alteração da concentração sérica. Em um segundo experimento, nas mesmas condições anteriormente citadas, alterando a fonte lipídica para 10% de óleo de girassol e 0,5% de colesterol, observou-se uma diminuição do triglicerídeo hepático em 23,18%, entretanto, novamente sem apresentar redução sérica. Rho et al. (2007) também evidenciaram uma redução do triglicerídeo hepático em 11,21%, em ratos tratados por 28 dias com BSP (black soy peptide), na concentração de 10%



(BSP-10) da caloria total procedente da fonte protéica, porém, os grupos BSP em 2% e 6% do valor calórico da dieta não mostraram redução.

Chen et al. (2003) não observaram redução em ratos alimentados com a fração não-digerida da proteína de soja. Contrariamente, Choi et al. (2005) mostraram, em camundongos diabéticos geneticamente modificados (KK-A<sup>y</sup>), com dieta normal e hiperlipídica, ambos alimentados com proteína isolada de *Panicum miliaceum* L., respectivamente, um aumento hepático do triglicerídeo em 50,78% e 21,06%; porém, o colesterol mostrou-se reduzido, respectivamente, em 30,77% e 27,27%. O resultado obtido neste estudo para o grupo tratado com fenofibrato foi semelhante ao reportado por Yamamoto et al. (1996), que observaram aumento de 30,30% do triglicerídeos hepático, em ratos *Wistar* com dieta suplementada com 0,05% do fenofibrato durante nove dias. Contrariamente, Tsutsumi et al. (2001) observaram redução significativa do triglicerídeo hepático, em ratos alimentados com 36% da caloria total procedente de álcool, tratados por quatro semanas com 30mg/kg/dia com fenofibrato.

Os resultados evidenciados neste estudo indicam que a proteína  $\beta$ -conglucina da soja tem efeito em vários índices importantes associados às lipoproteínas plasmáticas e na regulação do metabolismo lipídico. Para os efeitos provocados pela proteína da soja nas concentrações de colesterol total e triglicerídeos mostrados, respectivamente, nas figuras 12 e 13, tem-se postulado a idéia de que tais ações poderiam estar associadas por modificação da atividade de enzimas ligadas ao metabolismo lipídico, interações e pela modulação de mRNA.

Investiga-se a participação de peptídeos gerados na digestão gástrica/intestinal da proteína, que, atravessando a barreira intestinal, atingiriam o fígado, onde teriam papel na modulação da homeostase do colesterol (LOVATI et al.,

2000; DURANTI et al., 2004). A redução do colesterol tem sido mostrada como uma consequência do aumento dos receptores de LDL. Duranti et al. (2004) e Manzoni et al. (2003) reportaram que a globulina 7S desempenha um papel regulatório no metabolismo do colesterol em células HepG2, pelo aumento dos níveis de mRNA do receptor da LDL. Outros trabalhos sugerem que esta diminuição ocorre em consequência da interação dos peptídeos com o colesterol, metabólitos, esteróides neutros e sais biliares, promovendo a excreção que estimularia o fígado a recorrer à captação plasmática para manter a homeostase hepática (AOYAMA et al., 2001; IWAMI et al., 1986). Neste sentido, Fukui et al. (2004) observaram um aumento da excreção fecal do triglicérido e colesterol, devido à ação inibitória da interação com lipase pancreática, promovida pela  $\beta$ -conglucina ou peptídeos gerados da digestão, associado ao aumento da  $\beta$ -oxidação mitocondrial, redução da síntese de ácidos graxos e redução do peso hepático.

Moriyama et al. (2004) mostraram, em camundongos, que a  $\beta$ -conglucina reduziu a concentração de triglicérides séricos, provocada pela aceleração da  $\beta$ -oxidação associada à diminuição da atividade da ácido graxo sintetase. Iritani et al. (1996) mostraram a diminuição desta atividade e da lipogênese no tecido hepático de ratos. Sugano et al. (1982) observaram que estes efeitos promoveriam a redução da liberação de VLDL na corrente sanguínea, que estaria relacionada à diminuição dos níveis de colesterol e triglicérido sérico. Aoyama et al. (2000) e Shinjyo et al. (1992) reportaram, em ratos alimentados com proteína de soja versus caseína, uma redução significativa da gordura corporal e no nível de insulina. Este efeito estaria ligado à proteína de soja, que teria ação na conversão da tiroxina para triiodotironina, provocado pela alteração na expressão de genes de enzimas ligada à lipogênese hepática em ratos obesos. Esta observação sugere que a proteína teria ação sobre

o balanço hormonal e aumentaria o catabolismo lipídico, promovendo maior mobilização e diminuição do tecido adiposo.

Shukla et al. (2007), Torres et al. (2006) e Brandsch et al. (2006) reportaram que os efeitos hipocolesterolêmico e hipotrigliceridêmico podem ser consequência de uma importante regulação do SREBP, modulação na lipogênese hepática no mRNA do SREBP-1c (proteína-1c ligante do elemento regulatório de esterol) e mRNA da G6PDH (glicose-6-fosfato desidrogenase), envolvidos na síntese de triglicerídeos e colesterol no fígado, provocada por peptídeos formados durante a hidrólise da proteína de soja. Recentemente, em revisão publicada por Sirtori et al. (2008), tornou-se evidente a hipótese dos componentes peptídicos formados da hidrólise da proteína de soja, com menos de 15 aminoácidos que apresentam potencial para serem absorvidos, que teriam efeito hipocolesterolêmico, devido ativação de receptores de LDL. Lovati et al. (2008) confirmaram a suposição de participação de peptídeos neste evento, pelo isolamento de um oligopeptídeo da proteína de soja presente no hepatócito de ratos. A seqüência deste oligopeptídeo e as primeiras observações clínicas estão sendo aguardadas com expectativas.

## 6. CONCLUSÃO

Este estudo reportou o efeito da proteína  $\beta$ -conglícinina isolada da soja no metabolismo lipídico sérico e hepático de ratos alimentados com uma dieta indutora de hipercolesterolemia.

O método empregado para separação e isolamento da proteína mostrou-se eficiente apresentando um grau de pureza adequado às necessidades do experimento. A subunidade  $\beta$  representou a principal fração da composição da proteína  $\beta$ -conglícinina.

Os resultados *in vivo* mostraram que a proteína  $\beta$ -conglícinina promoveu redução dos níveis séricos de colesterol total, triglicerídeo, não-HDL-C e aumento menos significativo de HDL-C. Foi observado redução dos níveis de colesterol e triglicerídeo hepático nos grupos tratados com  $\beta$ -conglícinina. Porém, nos resultados reportados neste estudo, não se observou adição de efeitos quando a  $\beta$ -conglícinina foi associada ao fenofibrato.

A proteína  $\beta$ -conglícinina reduziu significativamente os efeitos dislipidêmicos séricos e hepáticos provocados pela dieta hipercolesterolemica em ratos, o que mostra importante ação na regulação do metabolismo lipídico. Os efeitos destacados podem estar associados a peptídeos desta proteína, muito embora os mecanismos envolvidos permaneçam ainda pouco esclarecidos.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADAMS, M. R.; GOLDEN, D. L.; ANTHONY, M. S.; REGISTER, T. C.; WILLIAMS, J. K. The Inhibitory effect of soy protein isolate on atherosclerosis in mice does not require the presence of LDL receptors or alteration of plasma lipoproteins. **J. Nutr.**, v. 132, p. 43 - 49, 2002.

ADAMS, M. R.; REGISTER, T. C.; GOLDEN, D. L.; WILLIAMS, J. K. Medroxyprogesterone acetate antagonizes inhibitory effects of conjugated equine estrogens on coronary artery atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.17, p. 217 - 221, 1997.

ANDERSON, T. J. Nitric oxide, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelial dysfunction. **Heart Fail Rev.**, v. 8, n. 1, p. 71-86, 2003.

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

ANONYMOUS, G. Effect of fenofibrate on progression of coronary- artery disease in type 2 diabetes: the diabetes atherosclerosis intervention study, a randomised study. **Lancet.** v. 357, p. 905 - 910, 2001.

ANTHONY, M. S.; CLARKSON, T. B.; HUGRES, C. L.; MORGAN, T. M.; BURKE, G. L. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. **J. Nutr.**, v. 126, p. 43 - 50, 1996.

AOAC. ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis.** 16<sup>th</sup> ed. Arlington, v.2. 1998. 99p.

AOYAMA, T.; FUKI, K. TAKAMATSU, K.; HASHIMOTO, Y.; YAMAMOTO, T. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (Yellow KK). **Nutrition.** v. 16, p. 349 - 354, 2000.

AOYAMA, T.; KOHNO, M.; SAITO, T.; FUKUI, K.; TAKAMATSU, K. YAMAMOTO, T.; HASHIMOTO, Y. HIROTSUKA, M.; KITO, M. Reduction by phytat-reduced soybean conglycinin of plasma triglyceride level of young and adult rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 65, p. 1071 - 1075, 2001.

ASSMANN, G; NOFER, J. R. Atheroprotective effects of highdensity lipoproteins. **Annu. Rev. Med.**, v. 54, p. 321 - 341, 2003.

BALFOUR, J. A.; MCTAVISH, D.; HEEL, R. C. Fenofibrate. A review of its phamacodynamic and phamacokinetic properties and therapeutic use in dyslipidaema. **Drugs.** v. 40, p. 260 - 290, 1990.

BALMIR, F.; STAACK, R. F.; JEFFERY, E. H.; POTTER, S. M. Soy bean isoflavones influence serum lipid levels in rats. **J. Nutr.**, v. 125, p. 805S, 1995.

BALOGUN, E. A. Arginine: lysine ratio as a contributory factor to the hypocholesterolemic effect of plant protein sources. **International Research Communications System J. Med. Sci.**, v. 10, p. 643 - 644, 1982.

BRANDSCH, C.; SHUKLA, A.; HIRCHE, F.; STANGL, G.; EDER, K. Effect of proteins from beef, pork, and turkey meat on plasma and liver lipids of rats compared with casein and soy protein. **Nutrition.** v. 22, p. 1162 - 1170, 2006.

BROOKS, J. R.; MORR, C. V. Current aspects of soybean protein fractionation and nomenclature. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 62, p. 1347 - 1354, 1985.

CANNON, R. O. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. **Clin. Chem.**,

v. 44, p. 1809 - 1819, 1998.

CARROL, K. K.; GIROUX, I.; KUROWSKA, E. M.; FREEMAN, D. J. Addition of arginine but not glycine to lysine plus methionine-enriched diets modulates serum cholesterol and liver phospholipids in rabbits. **J. Nutr.**, v. 129, p. 1807 - 1813, 1999.

CARROLL, K. K.; KUROWSKA, E. M. Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and human studies. **J. Nutr.**, v. 125, p. 594S - 597S, 1995.

CARROLL, K. K. Dietary protein, cholesterolemia and atherosclerosis. **Can. Med. Assoc. J.** v. 6, p. 147, 1992.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias**: bioquímica, propiedades funcionales, valor nutricional e modificaciones químicas. Zaragoza: Editorial Acribia. 1989. 346 p.

CHEN, J. R.; CHIOU, S. F.; SUETSUNA, K.; YANG, H. Y.; YANG, S. C. Lipid metabolism in hypercholesterolemic rats affected by feeding cholesterol-free diets containing different amounts of non-dialyzed soybean protein fraction. **Nutrition.** v. 19, p. 676 - 680, 2003.

CHINETTI, G.; LESTAVEL, S.; BOCHER, V.; REMALEY, AT.; NEVE, B.; TORRA, I. P.; TEISSIER, E.; MINNICH, A.; JAYE, M.; DUVERGER, N.; BREWER, H. B.; FRUCHART, J. C.; CLAVEY, V.; STAELS, B. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. **Nat Med.** v. 7, p. 53 - 58, 2001.

CHISOLM, G. M.; STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. **Free Radic Biol Med.**, v. 28, n. 12, p. 1815 - 1826, 2000.

CHOI, Y. Y. OSADA, K.; ITO, Y.; NAGASAWA, T.; CHOI, M. R.; NISHIZAWA, N. Effects of dietary protein of korean foxtail millet on plasma adiponectin, HDL-Cholesterol, and insulin levels in genetically type 2 diabetic mice. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 69, n. 1, p. 31 - 37, 2005.

CLARKSON, T. Soy, Soy Phytoestrogens and Cardiovascular Disease. **J. Nutr.**, v. 132, p. 566S - 569S, 2002.

COCKERILL, G. W. High-density lipoproteins differentially modulate cytokine-induced expression of E-selectin and cyclooxygenase-2. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 19, n. 4, p. 910 - 917, 1999.

CROUSE, J. R.; MORGAN T, TERRY, J. G.; ELLIS, J.; VITOLINS, M.; BURKE, G. L. A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. **Arch. Intern. Med.**, v. 159, p. 2070 - 2076, 1999.

CYBULSKY, M. I.; IYAMA, K.; Li, H.; ZHU, S.; CHEN, M.; IYAMA, M.; DAVIS, V.; GUTIERREZ-RAMOS, J. C.; CONNELLY, P. W.; MILSTONE, D. S. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. **J Clin Invest.**, v. 107, n. 10, p. 1255 - 1262, 2001.

DESCOVICH, G. C.; CEREDI, C.; GADDI, A. Multicentre study of soybean protein diet for out patient hyper-cholesterolaemic patients. **Lancet.** v. 2, p. 709 - 712, 1980.

DESHPANDE, S. S. Food legumes in human nutrition: a personal perspective. **Reviews in Food Sci. and Nutr.**, v. 32, p. 333 - 363, 1992.

DESHPANDE, S. S.; NIELSEN, S. S. Nitrogenous constituents of selected grain legumes. **J. Food Sci.**, v. 52, p. 1326, 1987.

DOMONEY, C. **Inhibitors of legume seeds**. In: SHEWRY, P. R.; CASEY, R. editors. Seed proteins. Amsterdam, 7, kluwer Academic Publishers, 635 - 55, 1999.

- DOUGLAS, G. ARMITAGE, J. A.; TAYLOR, P. D.; LAWSON, J. R.; MANN, G. E.; POSTON, L. Cardiovascular consequences of life-long exposure to dietary isoflavones in the rat. **J. Physiol.**, v. 571, n. 2, p. 477 - 487, 2006.
- DABAI, F. D.; WALKER, A. F.; SAMBROOK, I. E.; WELCH, V. A.; OWEN, R. W.; ABEYASEKERA, S. Comparative effects on blood lipids and faecal steroids of five legume species incorporated into a semi-purified, hypercholesterolaemic rat diet. **British Journal of Nutrition.** v. 75, p. 557 - 511, 1996.
- DURANTI, M.; SCARAFONI, A.; MAGNI, C. Molecular nutraceuticals as a mean to investigate the positive effects of legume seed proteins on human health. **Trends in Food Science & Technology.**, v. 18, p. 454 - 463, 2007.
- DURANTI, M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. **Fitoterapia.** v. 77, n. 2, p. 67 - 82, 2006.
- DURANTI, M.; LOVATI, M. R.; DANI, V.; BARBIROLI, A.; SCARAFONI, A.; CASTIGLIONI, S.; PONZONE, C.; MORAZZONI, P. The subunit from soybean 7S globulin lowers plasma lipids and upregulates liver VLDL receptors in rats fed a hypercholesterolemic diet. **J. Nutr.**, v. 134, p. 1334 - 1339, 2004.
- DURANTI, M.; GIUS, C. Legume seeds: protein content and nutritional value. **Field Crops Research.**, v. 53, p. 31 - 45, 1997.
- ERDMAN, J. W. Soy protein and cardiovaslar disease: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Comitte of the AHA. **Lipid and Lipopr Metab.**, v. 102, p. 2555 - 2559, 2000.
- FARZANA, W.; KHALIL, I. A. Protein quality of tropical food legumes. **Journal of Science and Technology.** v. 23, p. 13 - 19, 1999.
- FERREIRA, A. V. M.; PARREIRA, G. G.; GREEN, A.; BOTION, L. M. Fenofibrate prevents orotic acid—Induced hepatic steatosis in rats. **Life Sciences.** v. 82, p. 876 - 883, 2008.
- FERREIRA, A. V. M.; PARREIRA, G. G.; GREEN, A.; BOTION, L. M. Effects of fenofibrate on lipid metabolism in adipose tissue of rats. **Metabolism Clinical and Experimental.** v. 55, p. 731 - 735, 2006.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Food labeling:** health claims; soybean protein and coronary heart disease, Federal register/ rules and regulations. v. 64, n. 206, p. 57700 - 57733, 1999.
- FREDENRICH, A.; BAYER, P. Reverse cholesterol transport, high-density lipoproteins and HDL cholesterol: recent data. **Diabetes Metab.**, v. 29, n. 3, p. 201 - 205, 2003.
- FRIEDMAN, M.; BRANDON, D. L. Nutritional and health benefits of soy proteins. **J. Agric. and Food Chemist.**, v. 49, n. 3, p. 1069 - 1086, 2001.
- FUJITA, K.; EL-SHEMY, H. A.; AHMED, S. H. Differences in composition of glycinin and beta-conglycinin globulins in some legume cultivars. **Am. Biotechnol. Lab.**, v. 19, p. 46 - 48, 2001.
- FUKUI, K.; KOJIMA, M.; TACHIBANA, N.; KOHNO, M.; TAKAMATSU, K.; HIROTSUKA, M.; KITO, M. Effects of soybean conglycinin on hepatic lipid metabolism and fecal lipid excretion in normal adult rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 68, n. 5, p.1153 - 1155, 2004.
- FUKUI, K.; TACHIBANA, N.; WANEZAKI, S.; TSUZAKI, S.; TAKAMATSU, K.; YAMAMOTO, T.; HASHIMOTO, Y.; SHIMODA, T. Isoflavone-free soy protein prepared by column chromatography reduces plasma cholesterol in rats. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 5717 - 5721, 2002.

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.

GATEHOUSE, J. A. Sequence specificity of the post-translational proteolytic cleavage of vicilin, a seed storage protein of pea (*Pisum sativum* L.). **Biochem. J.**, v. 212, p. 427 - 432, 1983.

GIBBS, P. E. M.; STRONGIN, K. B.; MCPHERSON, A. Evolution of legume seed storage proteins: a domain common to legumins and vicilins is duplicated in vicilins. **Mol. Biol. Evol.**, v. 6, p. 614 - 623, 1989.

GIBNEY, N. J.; KRITCHEVSKY, D. **Animal and Vegetable Proteins in Lipid Metabolism and Atherosclerosis**. A R Liss, New York, 1983, 177p.

GREAVES, K. A.; WILSON, M. D.; RUDEL, L. L.; WILLIAMS, J. K.; WAGNER, J. D. Consumption of soy protein reduces cholesterol absorption compared to casein protein alone or supplemented with an isoflavone extract or conjugated equine estrogen in ovariectomized cynomolgus monkeys. **J. Nutr.**, v. 130, p. 820 - 826, 2000.

GREAVES, K. A.; PARKS, J. S.; WILLIAMS, J. K.; WAGNER, J. D. Intact dietary soy protein, but not adding an isoflavone-rich soy extract to casein, improves plasma lipids in ovariectomized cynomolgus monkeys. **J. Nutr.**, v. 129, p. 1585 - 1592, 1999.

GRILLO, L. P.; CRISPIM, S. P.; SIEBERT, A. N.; ANDRADE, A. T. W.; ROSSI, A.; CAMPO, I. C. Perfil lipídico e obesidade em escolares de baixa renda. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 8, n. 1, p. 75 - 81, 2005.

HAUG, A.; HOSTMARK, A. T. Lipoprotein upases, lipoproteins and tissue lipids in rats fed fish oil or coconut oil. **J. Nutr.**, v. 117, p. 1011 - 1017, 1987.

HODGSON, J. M.; PUDDEY, I. B.; BEILIN, L. J.; MORI, T. A.; CROFT, K. D. Supplementation with isoflavonoid phytoestrogens does not alter serum lipid concentrations: A randomized controlled trial in humans. **J. Nutr.**, v. 128, p. 728 - 732, 1998.

HOIE, L. M.; GRAUBAUM, H. J.; HARDE, A.; GRUENWALD, J.; WERNECKE, K. D. Lipid-Lowering Effect protein soybean in human. **Advances In Natural Therapy**, v. 22, n. 2, p. 175 - 189, 2005.

HORN, V. L.; MCCAIN, M.; KRIS-ETHERTON, P. M.; BURKE, F.; CARSON, J. A.; CHAMPAGNE, C. M.; KARMALLY, W.; SIKAND, G. The Evidence for Dietary Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease. **J. Am. Diet Assoc.**, v. 108, p. 287 - 331, 2008.

HOWES, J. B.; SULLIVAN, D.; LAI, N. The effects of dietary supplementation with isoflavones from red clover on lipoprotein profiles of post menopausal women with mild to moderate hypercholesterolaemia. **Atheroscler.**, v. 152, p. 143 - 147, 2000.

HUFF, M. W.; CARROLL, K. K. Effects of dietary proteins and amino acid mixtures on plasma cholesterol levels in rabbits. **J. Nutr.**, v. 110, p. 1676 - 1685, 1980.

HUFF, M. W.; HAMILTON, R. M. G.; CARROLL, K. K. Plasma cholesterol levels in rabbits fed low fat, cholesterol-free, semipurified diets: effects of dietary proteins, protein hydrolysates and amino acid mixtures. **Atheroscler.**, v. 28, p. 187-195, 1977.

HYMOWITZ, T.; HARLAN, J. R. Introduction of soybeans to North America by Samuel Bowen in 1765. **Econ., Bot.**, v. 37, p. 371 - 379, 1983.

IQBAL, A.; KHALIL, I. A.; ATEEQ, N.; KHAN, M. S. Nutritional quality of important food legumes. **Food Chemistry**, v. 97, p. 331 - 335, 2006.



- IRITANI, N.; HOSOMI, H.; FUKUDA, H.; TADA, K.; IKEDA, H. Soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in Wistar fatty rats. **J. nutr.**, v. 126, p. 380 - 388, 1996.
- IWAMI, K.; SAKAKIBARA, K.; IBUKI, F. Involvement of postdigestion 'hydrophobic' peptides in plasma cholesterol-lowering effect of dietary plant proteins. **Agric. Biol., Chem.**, v. 50, p. 1217 - 1222, 1986.
- JENKINS, A. J.; LYONS, T. J.; ZHENG, D.; OTVOS, J. D.; LACKLAND, D. T.; GEE, D. M.; GARVEY, W. T.; KLEIN, R. L. Serum lipoproteins in the diabetes control and complications trial/ epidemiology of diabetes intervention and complications cohort. **Diabetes Care**. v. 26, n. 3, p. 810 - 818, 2003.
- JENKINS, D.; KENDALL, C.; CONNELLY, P.; JACKSON, C.; PARKER, T. FAULKNER, D.; VIDGEN, E. Effects of high- and low-isoflavone (phytoestrogen) soy foods on inflammatory biomarkers and proinflammatory cytokines in middle-aged men and women. **Metabolism.**, v. 51, p. 919 - 924, 2002.
- JENKINS, D. J.; WOLEVER, T. M.; RAO, A. V.; HEGELE, R. A.; MITCHELL, S. J.; RANSOM, T. P.; BOCTOR, D. L.; SPADAFORA, P. J.; JENKINS, A. L.; MEHLING, C. Effect on blood lipids of very high intakes of fiber in diets low in saturated fat and cholesterol. **N. Engl. J. Med.**, v. 239, p. 21 - 26, 1993.
- JIALAL, I.; DEVARA, J. S. The role of oxidized low-density lipoprotein in atherogenesis. **J. Nutr.**, v. 126, p. 1053 - 1077, 1996.
- KERN, M.; ELLISON, D.; MARROQUIN, Y.; AMBROSE, M; MOSIER, K. Effects of Soy Protein Supplemented With Methionine on Blood Lipids and Adiposity of Rats. **Nutrition**. v. 18, p. 654 - 656, 2002.
- KERSTEN, S.; DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Roles of PPARs in health and disease. **Nature**. v. 405, p. 421 - 424, 2000.
- KERSTEN, S. Peroxisome proliferator activated receptor and obesity. **European Journal of Pharmacology**. v. 440, p. 223 - 234, 2002.
- KEYS, A. Seven Countries: **A Multivariate Analysis of Death and Coronary Heart Disease**. Cambridge, Mass: Harvard University Press; 1980. 381p.
- KINGMAN, S. M.; WALKER, A. F.; LOW, A. G.; SAMBROOK, I. E.; OWEN, R. W.; COLE, T. J. Comparative effects of four legume species on plasma lipids and faecal steroid excretion in hypercholesterolaemic pigs. **British Journal of Nutrition**. v. 69, p. 409 - 421, 1993.
- KINLAY, S.; LIBBY, P.; GANZ, P. Endothelial function and coronary artery disease. **Curr., Opinion Lipidology.**, v. 12, p. 383 - 389, 2001.
- KIRK, E. A.; SUTHERLAND, P.; WANG, S. A.; CHAIT, A.; LEBOEUF, R. C. Dietary Isoflavones Reduce Plasma Cholesterol and Atherosclerosis in C57BL/6 Mice but not LDL Receptor-Deficient Mice. **J. Nutr.**, v. 128, p. 954 - 959, 1998.
- KITAMURA, K. Genetic improvement of nutritional and food processing quality in soybean. **Japan Agric. Res. Quart.**, v. 29, n. 1, p. 1 - 8, 1995.
- KOHNO, M.; HIROTSUKA, M.; KITO, M.; MATSUZAWA, Y. Decreases in serum triacylglycerol and visceral fat mediated by dietary soybean betaconglycinin. **J. Atheroscler. Thromb.**, v. 13, p. 247 - 255, 2006.
- KONTUSH, A.; CHANTEPIE, S.; CHAPMAN, S. J. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 23, n. 10, p. 1881-1888, 2003.
- KOSHIYAMA, I. **Storage proteins of soybean**. In: eds. W, Gottschalk and H. P. Muller, Seed

Proteins, Biochemistry, Genetics. Nutritive Value, Martinus Nijhoff/Dr, W, Junk Publishers: The Hague, p. 428 - 450, 1983.

KRITCHEVSKY, D. Dietary fat and atherosclerosis. **J. Nutr. Biochem.**, v. 13, p. 391, 2002.

KRITCHEVSKY, D. Vegetable protein and atherosclerosis. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 56, p. 130 -140, 1979.

KUSHI, L. H.; MEYER, K. A.; JACOBS, D. R. Cereals, legumes, and chronic disease risk reduction: evidence from epidemiologic studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, n. 70, p. 451S - 458S, 1999.

KWOK, F.; MA, C. Y.; LIU, W. S.; KWOK, K. C. Isolation and characterization of proteins from soymilk residue (okara). **Food Research International**. v. 29, n. 8, p. 199 - 805, 1997.

LAEMLLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, **Nature**. v. 227, p. 680 - 684, 1970.

LAFORST, L.; MOULIN, P.; SOUCHET, T.; RITLENG, C.; DESAMERICQ, G.; LE JEUNNE, P.; SCHWALM, M. S.; KIEFFER, A.; VAN GANSE, E. Correlates of LDL-cholesterol goal attainment in patients under lipid lowering therapy. **Atherosclerosis**. v. xx, p. xx - xx, 2008.

LAMPE, J. Health effects of vegetable and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, n. 3, p. 475 - 490, 1999.

LEFEVRE, M.; SCHNEEMAN, A. O. Casein or Soy Protein Isolate. **J. Nutr.**, v. 114, p. 768 - 777, 1984.

LICHTENSTEIN, A. H. Lipoprotein response to diets high in soy or animal protein with and without isoflavones in moderately hypercholesterolemic subjects. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 22, p. 1852 - 1858, 2002.

LIMA, E. S.; COUTO, R. D. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade: Structure, metabolism and physiologic functions of high-density lipoproteins. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n. 3, p. 169 - 178, 2006.

LIU, R. H. Whole grain phytochemicals and health. **Journal of Cereal Science**. v. 46, p. 207 - 219, 2007.

LIU, R. H. Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 78, p. 517S - 520S, 2003.

LIU, K. Expanding soybean food utilization. **Food Technol.**, v. 54, p. 46 - 58, 2000.

LIU, K. **Soybeans**: chemistry, technology, and utilization, New York: Chapman & Hall, 1997. 532 p.

LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; PIZZAGALLI, A.; CASTIGLIONI, S.; DURANTI, M. M. Polypeptide from 7S soy globulin alfa' subunit up-regulates ldl-receptors in Hep-G2 cells. **FASEB J**. v. 22. p. 303 - 307, 2008.

LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; PIZZAGALLI, A.; CASTIGLIONI, S.; DURANTI, M. M.. Soy proteins: mechanism for cholesterol reduction. Abstracts Issue: **Journal of Clinical Lipidology**., v. 1, n. 5, p. 93, 2007.

LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; PIZZAGALLI, A.; CASTIGLIONI, S.; DURANTI, M. M.; MAGNI, C. Soy Protein Peptides Regulate Cholesterol Homeostasis in Hep G2 Cells. **J. Nutr.**, v. 130, p. 2543 - 2549, 2000.

LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; CORSINI, A.; GRANATA, A.; FUMAGALLI, R.; SIRTORI, C. R. 7S Globulin from soybean is metabolized in human cell cultures by a specific uptake and degradation system. **J. Nutr.**, v. 126, p. 2831 - 2842, 1996.

LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; CORSINI, A.; GRANATA, A.; FUMAGALLI, R.; SIRTORI, C. R. Low density lipoprotein receptor activity is modulated by soybean globulins in cell culture. **J. Nutr.**, v. 122, p. 1971-1978, 1992.

LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; CANAVESI, A.; SIRTORI, M.; VACCARINO, V.; MARCHI, M.; GADDI, G. Studies on the mechanism of the cholesterol lowering activity of soy protein, Soy protein extract reduces plasma cholesterol and increases liver b-receptors in mice. **Nutr. Metab. Cardiovasc., Dis.**, v. 1, p. 18 - 24, 1991.

LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; CANADESI, A.; VACCARINO, V.; MARCHI, M.; GADDI, G.; SIRTORI, M. Soybean Protein Diet Increases Low Density Lipoprotein Receptor Activity in Mononuclear Cells from Hypercholesterolemic Patients. **J. Clin. Invest.**, v. 80, p. 1498 - 1502, 1987.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265 - 275, 1951.

MACKNESS, M. I.; DURRINGTON, P. N.; MACKNESS, B. How high-density lipoprotein protects against the effects of lipid peroxidation. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 11, n. 4, p. 383 - 388, 2000.

MADANI, S.; PROST, J.; BELLEVILLE, J. Effects of dietary protein level and origin in the rat. **Nutrition.** v. 16, p. 368 - 375, 2000.

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

MANCINI, F. P.; LANNI, A.; SABATINO, L.; MORENO, M.; GIANNINO, A.; CONTALDO, F.; COLANTUONI, V.; GOGLIA, F. Fenofibrate prevents and reduces body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats. **FEBS Letters.** v. 491, p. 154 - 158, 2001.

MANNING, J. M. Effects of hormone replacement modalities on low density lipoprotein composition and distribution in ovariectomized cynomolgus monkeys. **Atheroscler.**, v. 121, p. 217 - 230, 1996.

MANZONI, C.; DURANTI, M.; EBERINI, I.; SCHARNAG, H.; MÄRZ, W.; CASTIGLIONI, S.; LOVATI, M. R. Subcellular localization of Soybean 7S Globulin in HepG2 Cells and LDL Receptor Up-Regulation by Its Constituent Subunit. **J. Nutr.**, v. 133, p. 2149 - 2155, 2003.

MAZUR, W. M.; DUKE, J. A.; WAHALA, K. Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. **J. Nutr. Biochem.**, v. 9, n. 4, p. 193 - 200, 1998.

MC-NAMARA, D. J. Dietary cholesterol and atherosclerosis. **Mol. and Cell Biology of Lipids.**, v. 1529, n. 3, p. 310 - 320, 2000.

MEEKER, D. R.; KESTEN, H. D. Effect of high protein diets on experimental atherosclerosis of rabbits. **Arch., Pathol.**, v. 31, p. 147 - 162, 1941.

MEINERTZ, H.; NILAUSEN, K.; HILDEN, J. Alcohol-extracted, but not intact, dietary soy protein lowers lipoprotein (a) markedly. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 22, p. 312 - 316, 2002.

METAIS, C.; FORCHERON, F.; ABDALLAH, P.; BASSET, A.; DEL CARMINE, P.; BRICCA, G. B. Adiponectin receptors: expression in Zucker diabetic rats and effects of fenofibrate and metformin. **Metabolism Clinical and Experimental.** v. 57, p. 946 - 953, 2008.

MIETFINEN, T. A.; PUSKA, P.; GYLLING, H. Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. **N. Engl. J. Med.**, v. 333, p. 1308 -1312, 1995.

MORIYAMA, T.; KISHIMOTO, K.; NAGAI, K.; URADE, R.; OGAWA, T.; UTSUMI, S.; MARUYAMA, N.; MAEBUCHI, M. Soybean p-conglycinin diet suppresses serum triglyceride level in normal and genetically obese mice by induction of beta-oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 68, n. 2, p. 352 - 359, 2004.

NAGANO, T.; HIROTSUKA, M.; MORI, H.; KOHYAMA, K.; NISHINARI, K. Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans. **J. Agric. Food Chem.**, v. 40, p. 941 - 944, 1992.

NAGATA, C.; TAKATSUKA, N.; KURISU, Y.; SHIMIZU, H. Decreased Serum Total Cholesterol Concentration Is Associated with High Intake of Soy Products in Japanese Men and Women. **J. Nutr.** v. 128, p. 209 - 213, 1998.

NAGATA, Y.; ISHIWAKI, N.; SUGANO, M. Studies on the mechanism of antihypercholesterolemic action of soy protein and soy protein-type amino acid mixtures in relation to the casein counterparts in rats. **J. Nutr.**, v. 112, p. 1614 - 1625, 1982.

NAGAYAMA, T.; TSUCHIYA, A.; KASAI, H.; ARAKAWA, R.; SAITO, K. Hypolipidemic mechanisms of fenofibrate: Lipid influx into the circulation of rats. **Jpn. Pharmacol. Ther.**, v. 23, p. 197 - 204 (suppl.1), 1995.

NATH, N.; WIENER, R.; HARPER, A. E.; ELVEHJEM, C. A. Diet and cholesterolemia, I. Development of a diet for the study of nutritional factors affecting cholesterolemia in the rat. **J. Nutr.**, v. 67, p. 289 - 307, 1959.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for care and use of laboratory animals**. Publication 85-23, Revised ed, Washington, DC: National Academy of Sciences; 1985.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Food and Nutrition Board**. Recommended Dietary Allowance. 10th ed, National Academy Press, Washington DC, 1989.

NCEP III. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. **Circulation.**, v. 106, p. 3143 - 3421, 2002.

NESTEL, P. J.; POMEROY, S.; KAY, S.; KOMESAROFF, P.; BEHRING, J.; CAMERON, J. D.; WEST, L. Isoflavones from red clover improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 84, p. 895 - 898, 1999.

NESTEL, P. J.; YAMASHITA, T.; SASAHARA, T.; POMEROY, S.; DART, A.; KOMESAROFF, P.; OWEN, A.; ABBEY, M. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 17, p. 3392 - 3398, 1997.

NOFER, J. R.; KEHREL, B.; FÖBKERA, M.; LEVKAUB, B.; ASSMANN, G.; ECKARDSTEINA, A. V. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. **Atheroscler.**, v. 161, n. 1, p. 1 - 16, 2002.

NOFER, J. R.; WALTER, M.; KEHREL, B.; WIERWILLE, S.; TEPEL, M.; SEEDORF, U.; ASSMANN, G. HDL3-mediated inhibition of thrombin-induced platelet aggregation and fibrinogen binding occurs via decreased production of phosphoinositide-derived second messengers 1,2-diacylglycerol and inositol 1,4,5-trisphosphate. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 18, p. 861 - 869, 1998.

- PAK, V. V.; KOO, M.; LEE, N.; LEE, J. S.; KASIMOVA, T. D.; KWON, D. Y. Isolation and identification of peptides from soy 11s-globulin with hypocholesterolemic activity. **Chemistry of Natural Compounds**. v. 41, n. 6, p. 710 - 714, 2005.
- PASCAL, M. Mechanism of action of fenofibrate: New data. In: Paoletti, R et al., Drug affecting lipid metabolism. Berlin: **Springer**, p. 319-323, 1987.
- POTTER, S. M. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. **J. Nutr.**, v. 125, p. 606S - 6061S, 1995.
- POURBAIX, S.; HELLER, F.; HARVENGT, C. Effect of fenofibrate and LF 2151 on hepatic peroximes in hamsters. **Biochem. Pharmacol.**, v. 33, p. 1153 - 1155, 1984.
- REDDY, J. K. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis – peroxisomal  $\beta$  oxidação, PPAR $\alpha$ , and steatohepatitis. **Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.**, v. 281, p. 1333 - 1339, 2001.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, 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, p. 1939 - 1951, 1993.
- REYNOLDS, K.; CHIN, A.; LEES, K. A Meta-Analysis of the Effect of Soy Protein Supplementation on Serum Lipids. **Am. J. Cardiol.**, v. 98, p. 633 - 640, 2006.
- RHO, S. J.; PARK, S. P.; AHN, C. W.; SHIN, J. K.; LEE, H. G. Dietetic and hypocholesterolaemic action of black soy peptide in dietary obese rats. **J. Sci. Food Agric.**, v. 87: p. 908–913, 2007.
- RIDDELL, D. R.; GRAHAM, A.; OWEN, J. S. Apolipoprotein E inhibits platelet aggregation through the L-arginine: nitric oxide pathway, Implications for vascular disease. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 1, p. 89 - 95, 1997.
- ROSELL, M. S.; APPLEBY, P. N.; SPENCER, E. A.; KEY, T. J. Soy intake and blood cholesterol concentrations: a cross-sectional study of 1033 pre- and postmenopausal women in the Oxford arm of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 80, p. 1391 - 1396, 2004.
- ROSS, R. **Patogênese da aterosclerose**. In: BRAUNWALD, E. (Ed.). Tratado de medicina cardiovascular. 5.ed. São Paulo: Roca, 1999, cap,14, p,1179-1198.
- SACKS, F. M.; LICHTENSTEIN, A.; VAN HORN, L.; HARRIS, W.; KRIS-ETHERTON, P.; WINSTON, M. Soy Protein, Isoflavones, and Cardiovascular Health an American Heart Association Science Advisory for Professionals from the Nutrition Committee. **Circulation**. v. 113, p. 1034 - 1044, 2006.
- SACKS, F. M.; BRESLOW, J. L.; WOOD, P. G.; KASS, E. H. Lack of an effect of dairy protein (casein) and soy protein on plasma cholesterol of strict vegetarians: an experiment and a critical review. **J. Lipid. Res.**, v. 24, p. 1012 - 1020, 1983.
- SANCHEZ, A.; HUBBARD, R. W. Plasma amino acids and the insulin/ glucagon ratio as an explanation for the dietary protein modulation of atherosclerosis. **Med Hypotheses**. v.36, p. 27 - 32, 1991.
- SANCHEZ, A.; RUBANO, D. A.; SHAVLIK, G. W.; HUBBARD, R.; HORNING, M. C. Cholesterolic effects of the lysine/arginine ratio in rabbits after initial early growth. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v. 38, p. 229 - 238, 1988.
- SANDERS, T. A. B.; DEAN, T. S.; GRAINGER, D.; MILLER, G. J.; WISEMAN, H. Moderate intakes of intact soy protein rich in isoflavones compared with ethanol-extracted soy protein increase HDL but do not influence transforming growth factor-1 concentrations and hemostatic risk factors for coronary

heart disease in healthy subjects. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 76, p. 373 - 377, 2002.

SANTOS, R. D. III Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 77, p. 1 - 48, 2001. Suplemento, 3.

SAUTIER, C.; FLAMENT, C.; DOUCET, C.; SUQUET, J. P. Effect of eight dietary proteins and their amino acid content on serum, hepatic and fecal steroids in the rat. **Nutr. Rep. Int.**, v. 34, p. 1051 - 1059, 1986.

SAWASHITA, N. Effect of dietary vegetable and animal proteins on atherothrombosis in mice. **Nutrition**. v. 22, p. 661 - 667, 2006.

SCHOLZ, G.; MANTEUFEEL, R.; MÜNTZ, K.; RUDOLPH, A. Low molecular-weight polypeptides of vicilin from *Vicia faba* L. are products of proteolytic breakdown. **Eur. J. Biochem.**, v. 132, p. 103 - 107, 1983.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517p.

SHINJO, S.; ASATO, L.; ARAKAKI, S. Comparative effect of casein and soybean protein isolate on body fat accumulation in adult rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v. 38, p. 247 - 251, 1992.

SHUKLA, A.; BRANDSCH, A.; BETTZIECHE, F.; HIRCHE, G.; STANGL, K. EDER. Isoflavone-poor soy protein alters the lipid metabolism of rats by SREBP-mediated down-regulation of hepatic genes. **J. Nutr. Biochem.**, v. 18, p. 313 - 321, 2007.

SHUTOV, A. D.; KAKHOVSKAYA, I. A.; BRAUN, H.; BÄUMLEIN, H.; MÜNTZ, K. Legumin-like and vicilin-like seed storage proteins: evidence for a common single-domain ancestral gene. **J. Mol. Evol.**, v. 41, p. 1057 - 1069, 1995.

SIMON, A. E.; TENBARGE, KAREN, M.; SCOFIELD, S. R.; FINKELSTEIN, R. R.; CROUCH, M. L. Nucleotide sequence of a Cdna clone of *Brassica napus* 12S storage protein shows homology with legumin from *Pisum sativum*. **Plant. Mol. Biol.**, v. 5, p. 191 - 201, 1985.

SIMONS, L. A.; VON KONIGSMARK, M.; SIMONS, J.; CELERMAJER, D. S. Phytoestrogens do not influence lipoprotein levels or endothelial function in healthy, postmenopausal women. **Am. J. Cardiol.**, v. 85, p. 1297 - 1301, 2000.

SINGH, R.; SINGH, G.; CHAUHAN, G. S. Nutritional evaluation of soy-fortified biscuits. **J. Food Sci. Technol.**, v. 37, p. 162 -164, 2000.

SIRTORI, C. R.; GALLI, G.; ANDERSON, J. W.; ARNOLDI, A. Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Focus on dietary proteins. **Atherosclerosis**. v. xx, p. xx - xx, (2008).

SIRTORI, C. R. Drugs affecting HDL. Abstracts Issue: **Journal of Clinical Lipidology**. v. 1, n. 5, p. 5, 2007.

SIRTORI, C. R.; LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; CASTIGLIONI, S.; DURANTI, M.; MAGNI, C.; MORANDI, S.; D'AGOSTINA, A.; ARNOLDI, A. Proteins of White Lupin Seed, a Naturally Isoflavone-Poor Legume, Reduce Cholesterolemia in Rats and Increase LDL Receptor Activity in HepG2 Cells. **J. Nutr.**, v. 134, v. 18 - 23, 2004.

SIRTORI, C. R.; LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; GIANAZZA, E.; BONDIOLI, A.; STAELS, B.; AUWERX, J. Reduction of serum cholesterol by soybean proteins: clinical experience and potential molecular mechanisms. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.**, v. 8, p. 334 - 340, 1998.

- SIRTORI, C. R. LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; MONETTI, M.; PAZZUCCONI, F.; GATTI, E. Soy and cholesterol reduction: clinical experience-1. **J. Nutr.**, v. 125, p. 598S - 605S, 1995.
- SIRTORI, C. R.; GALLI, G.; LOVATI, M. R.; CARRARA, P.; BOSISIO, E.; GALLI KIENLE, M. Effects of dietary proteins on the regulation of liver lipoprotein receptors in rats. **J. Nutr.** v. 114, p. 1493 - 1500, 1984.
- SIRTORI, C. R.; GATTI, E.; MANIERO, O.; CONTI, F.; AGRADI, E.; TREMOLI, E.; SIRTORI, M.; FRATERRIGO, L.; TAVAZZI, L.; KRITCHEVSKY, D. Clinical experience with the soybean protein diet in the treatment of hypercholesterolemia. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 32, p. 1645 - 1658, 1979.
- SIRTORI, C. R. et al. Soybean- protein diet in the treatment of type-II hyperlipoproteinaemia. **Lancet.** v. 1, p. 275 - 277, 1977.
- SONG, T.; LEE, S. O.; MURPHY, P. A.; HENDRICH, S. Soy Protein With or Without Isoflavones, Soy Germ and Soy Germ Extract, and Daidzein Lessen Plasma Cholesterol Levels in Golden Syrian Hamsters. **Exp. Biol. Med.**, v. 228, p. 1063 - 1068, 2003.
- SOTOMAYOR, A. M. Fenofibrate improves age-related endothelial dysfunction in rat resistance arteries. **Atherosclerosis.** v. 193, p. 112 - 120, 2007.
- SRIVASTAVA, R. A.; JAHAGIRDAR, R.; AZHAR, S.; SHARMA, S.; BISGAIER, S. L. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha selective ligand reduce adiposity, improves insulin sensitivity and inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. **Mol. Cell Biochem.**, v. 14, p. 1 - 14, 2006.
- STAELS, B.; KOENIG, W.; HABIB, A.; MERVAL, R.; LEBRET, M.; PINEDA TORA, I. Activation of human aortic smooth-muscles is inhibited by PPAR $\alpha$  but not PPAR $\gamma$  activators. **Nature.** v. 393, p. 790 - 793, 1998.
- SUGANO, M.; GATCHALIAN-YEE, M.; ARIMURA, Y.; OCHIAI, E.; YAMADA, K. Soybean Protein Lowers Serum Cholesterol Levels in Hamsters: Effect of Debittered Undigested Fraction. **Nutrition.** v. 13, p. 633 - 639, 1997.
- SUGANO, M.; GOTO, S.; YAMADA, Y.; YOSHIDA, K. Cholesterol-lowering activity of various undigested fractions of soybean protein in rats. **J. Nutr.**, v. 120, p. 977 - 981, 1990.
- SUGANO, M.; YAMADA, Y.; YOSHIDA, K.; HASHIMOTO, Y.; MATSUO, T.; KIMOTO, M. The hypocholesterolemic action of the undigested fraction of soybean protein in rats. **Atheroscler.**, v. 72, p. 115 - 122, 1988.
- TONSTAD, S.; SMERUD, K.; HOIE, L. A comparison of the effects of 2 doses of soy protein or casein on serum lipids, serum lipoproteins, and plasma total homocysteine in hypercholesterolemic subjects. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 76, p. 78 - 84, 2002.
- TOOLE, D. K. O. Characteristics and Use of Okara, the Soybean Residue from Soy Milk ProductionsA Review. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 363 - 371, 1999.
- TORRES, N.; TORRE-VILLALVAZO, I.; TOVAR, A. R. Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. **J. Nutr. Biochem.**, v. 17, p. 365 - 373, 2006.
- TOVAR-PALACIO, C.; POTTER, S. M.; HAFERMANN, J. C.; SHAY, N. F. Intake of soy protein and soy protein extracts influences lipid metabolism and hepatic gene expression in gerbils. **J. Nutr.**, v. 128, p. 839 - 842, 1998.
- TSUTSUMI, M.; TAKSE, S. Effect of Fenofibrate on Fatty Liver in Rats Treated With Alcohol. **Alcoholism: clinical and experimental research.** v. 25, n. 6, p. 785S - 789S, 2001.

USDA. US Department of Agriculture, Department of Health and Human Services. **Nutrition and Your Health: Dietary Guidelines for Americans**. Washington, DC, 2005. 71p.

VAN RAAIJ, J. M.; KATAN, M. B.; WEST, C. E.; HAUTVAST, J. G. Influence of diets containing casein, soy isolate, and soy concentrate on serum cholesterol and lipoproteins in middle-aged volunteers. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 35, p. 925 - 934, 1982.

VAN RAAIJ, J. M.; KATAN, M. B.; HAUTVAST, J. G.; HERMUS, R. J. Effects of casein versus soy protein diets on serum cholesterol and lipoproteins in young healthy volunteers. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 34, p. 1261 - 1271, 1981.

VESSBY, B.; LITHELL, H. Interruption of long-term lipid-lowering treatment with bezafibrate in hypertriglyceridaemic patients. Effects on lipoprotein composition, lipase activities and the plasma lipid fatty acid spectrum. **Atheroscler.** v. 83, p. 137 - 143, 1990.

VON ECKARDSTEIN, A.; NOFER, J. R.; ASSMANN, G. High-density lipoprotein and atherosclerosis: role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, n.1, p. 13 - 27, 2001.

WASHBURN, S.; BURKE, G. L.; MORGAN, T.; ANTHONY, M. Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women. **Menopause.** v. 6, p. 7 - 13, 1999.

WILSON, T. A.; NICOLOSI, R. J.; KOTYLA, T.; FLECKINGER, B. Soy protein without isoflavones reduces aortic total and cholesterol ester concentrations. **Nutr. Resear.**, v. 27, p. 498 - 504, 2007.

WOLF, W. J. Soybean proteins: their functional, chemical and physical properties. **J. Agric. Food Chem.**, v. 18, p. 969 - 976, 1970.

WONG, W. W. ; SMITH, E. O.; STUFF, J. E.; HACHEY, D. L.; HEIRD, W. C.; POWNELL, H. J. Cholesterol-lowering effect of soy protein in normocholesterolemic and hypercholesterolemic men. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 68, p. 1385S - 1389S, 1998.

YAMADA, Y.; MATSUO, H.; WARITA, S.; WATANABE, S.; KATO, K.; OGURI, M.; YOKOI, K.; METOKI, N.; YOSHIDA, H.; SATOH, K. Prediction of genetic risk for dyslipidemia. **Genomics.** v. 90, p. 551 - 558, 2007.

YAMAMOTO, K.; FUKUDA, N.; ZHANG, L.; SAKAI, T. Altered hepatic metabolism of fatty acids in rats fed a hypolipidaemic drug, fenofibrate. **Pharmacological Research.** v. 33, n. 6, p. 337 - 342, 1996.

YOUNG, C. E.; KARAS, R. H.; KUVIN, J. T. High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease. **Cardiol. Rev.**, v. 12, n. 2, p. 107 - 119, 2004.

ZHANG, G. Y. ; HAYASHI, Y.; MATSUMOTO, S.; MATSUMURA, Y.; MORI, T. Molecular species of glycinin in some soybean cultivars. **Phytochemistry.** v. 60, p. 675 - 681, 2002.

ZHONG, F.; LIU, J.; MA, J.; SHOEMAKER, C. F. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. **Food Research International.** v. 40, p. 661 - 667, 2007.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)