

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ASPECTO FUNCIONAL DA FRAÇÃO 11S DO GRÃO DE BICO (*Cicer
arietinum* L.) NO QUADRO DE HIPERLIPIDEMIA EM MODELO
ANIMAL**

ANA LÚCIA DA SILVA AMARAL

MESTRANDA

Prof^ª. Dr^ª. AURELUCE DEMONTE

ORIENTADORA

ARARAQUARA, 2012.

ANA LÚCIA DA SILVA AMARAL

**ASPECTO FUNCIONAL DA FRAÇÃO 11S DO GRÃO DE BICO (*Cicer
arietinum* L.) NO QUADRO DE HIPERLIPIDEMIA EM MODELO
ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – FCFar/UNESP, como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição, na Área de Ciências Nutricionais.

ARARAQUARA, 2012.

Ficha Catalográfica

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

A485a Amaral, Ana Lúcia da Silva
Aspecto funcional da fração 11S do grão de bico (*Cicer arvense* L.) no quadro de hiperlipidemia em modelo animal / Ana Lucia da Silva Amaral. – Araraquara, 2012
91 f.

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

1. 11S grão de bico. 2. Hiperlipidemia. 3. Dieta hipercolesterolêmica. 4. Efeito hipotriglicéidêmico I. Demonte, Aureluce, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Aureluce Demonte
(orientadora)

Prof. Dr. Valdir Augusto Neves
(membro)

Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli
(membro)

Maria Regina Barbiéri de Carvalho
(membro)

Olga Luísa Tavano
(membro)

Araraquara, outubro de 2012.

Dedico

À minha mãezinha... pelo amor e apoio incondicional!!!!

Agradeço,

À Deus, por tantas dádivas concedidas e pelo amparo em tantos momentos difíceis...

À minha mãe por acreditar nos meus sonhos, me incentivar em todos os momentos e por se sentir feliz pelas minhas conquistas, até mesmo quando não compreendia completamente o motivo da tanta alegria por algo aparentemente tão simples...

À professora Aureluce Demonte pela orientação, carinho, dedicação, por reconhecer meu esforço, acreditar no meu trabalho e pelos inúmeros ensinamentos...

Ao professor Valdir, por me acolher no laboratório de Bioquímica de Alimentos, pela paciência em esclarecer todas as minhas dúvidas, pelo carinho e oportunidade...

À Maraiza, por me apresentar um mundo novo de reagentes, soluções, conceitos e técnicas com uma simplicidade indescritível... por acreditar em mim, me apoiar e me dar a honra da sua amizade sincera...

Ao Ederlan e a Rosana, por compartilharem suas experiências e principalmente por me ensinarem a respeitar os animais...

A todos que me auxiliaram durante a execução do experimento... Adriana, Valéria, Rosana, Maraiza, Prof. Valdir e Profa. Aureluce, Valéria, Vânia, Juliana Bassan e Ederlan... sem o auxílio de vocês o experimento não teria se concretizado...

À Bárbara Rocha, Adriele Lima, Raquel Aizemberg, Juliana Bassan, Maraiza, Flávia Santos e Gabriela Merussi, pela amizade verdadeira, por ouvirem minhas alegrias, dúvidas e reclamações e terem sempre uma palavra de conforto e carinho, pelos sorrisos e momentos únicos que passei com cada uma... Vocês foram essenciais na minha formação profissional e principalmente em meu crescimento pessoal...

Ao Geraldo César e família que me acompanharam e me incentivaram em tantos momentos...

As amizades que cativei durante toda minha caminhada... Guto, Adriana, Elizene, Gilberto e família, D.Maria, colegas de sala e funcionários da FCFar- UNESP.

À Elaine, que me ajudou a compreender tantos acontecimentos, encorajando-me a dar passos importantes principalmente em minha atuação profissional...

Aos funcionários da sessão de pós graduação e biblioteca pela colaboração em todos momentos em que solicitei...

Aos docentes, pelas experiências e conhecimentos transmitidos...

À banca examinadora, por compartilhar suas opiniões e enriquecer meu trabalho...

Aos meus familiares, pelo apoio e compreensão...

Ao César, que acompanhou os últimos momentos, me encorajando e apoiando em tudo.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização de todas as etapas que vivenciei na pós graduação.

'A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.'

Albert Einstein.

RESUMO

Vários estudos têm demonstrado que proteínas de leguminosas como soja, grão de bico, lentilhas e alguns feijões possuem propriedades hipocolesterolêmicas e hipotrigliceridêmicas, embora o mais comum seja a utilização de fármacos nestes quadros. Em função da composição proteica do grão de bico e da possível homologia funcional com as demais proteínas de leguminosas, esse estudo teve por objetivo verificar a ação da proteína do tipo legumina (11S) do grão de bico administrada oralmente como suplemento em animais hipercolesterolêmicos induzidos pela dieta. Foram analisados crescimento ponderal, consumo alimentar, excreção fecal, concentração sérica e hepática de colesterol total, triglicerídeos, fração HDL e não-HDL além da excreção de lipídeos totais e colesterol. Houve diferença entre o aspecto dos fígados dos grupos estudados decorrente do consumo da dieta hipercolesterolêmica e ação do fármaco. A administração diária de 300 mg/kg de peso corpóreo da fração 11S do grão de bico apesar de não apresentar efeito sobre os níveis séricos de colesterol total provocou uma diminuição de 28,77% nos níveis de triglicerídeos e de 51,48% e 82,70% nas concentrações hepáticas de colesterol total e triglicerídeos, respectivamente. Esses resultados mostram que a fração 11S do grão de bico possui efeito hipotrigliceridêmico e que as globulinas 11S de leguminosas podem apresentar ações fisiológicas diferentes sobre o metabolismo lipídico.

ABSTRACT

Several studies have shown that proteins of legumes like soybeans, chickpeas, lentils and beans have some hypocholesterolemic properties and hypotriglyceridemic, although the most common is the use of drugs in these situations. Devide to the protein composition of chickpea and possible functional homology with other legume proteins, this study aimed to verify the effect of protein type legumin (11S) of chickpeas administered orally as a supplement in animals induced hypercholesterolemic diet. We analyzed weight growth, food consumption, fecal excretion, serum and hepatic total cholesterol, triglycerides, HDL and non-HDL beyond the excretion of total lipids and cholesterol. There was a difference between the appearance of the livers of groups arising from the consumption of hypercholesterolemic diet and drug action. The daily administration of 300 mg / kg body weight fraction of 11S chickpea although not have an effect on serum total cholesterol caused a decrease of 28.77% in the levels of triglycerides and 82% to 51.48 70% liver concentrations of total cholesterol and triglycerides, respectively. These results show that the fraction of 11S chickpeas has effect hypotriglyceridemic and 11S globulins of legumes may have different physiological actions on lipid metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil cromatográfico da 11S do grão de bico em coluna Sepharose CL 6B.....	12
Figura 2. SDS Page da globulina total, globulina 11S isolada de grão de bico e do pico cromatográfico da coluna Sepharose CL 6B.....	12
Figura 3. Fígado dos grupos experimentais após 28 dias de tratamento.....	12
Figura 4. Concentração plasmática de colesterol total dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias.....	12
Figura 5. Concentração plasmática de triglicerídeos dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias.....	12
Figura 6. Concentração plasmática da lipoproteína HDL-C dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias.....	12
Figura 7. Concentração plasmática da fração não-HDL dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias.....	12
Figura 8. Índice aterogênico dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias.....	12
Figura 9. Concentração de glicose plasmática dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias.....	12
Figura 10. Concentração hepática de colesterol total dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias.....	12
Figura 11. Concentração de triglicerídeos hepáticos dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias.....	12
Figura 12. Lipídeos totais extraídos das fezes dos grupos com diferentes tratamentos nos 5 dias finais de experimento.....	12
Figura 13. Colesterol total das fezes dos grupos com diferentes tratamentos nos 5 dias finais de experimento.....	12

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas experimentais.....	23
Tabela 2. Composição química determinada segundo AOAC (1998).....	25
Tabela 3. Peso corporal, ganho de peso, consumo alimentar e excreção dos grupos experimentais.....	25
Tabela 4. Peso do fígado e índice hepatossomático dos grupos experimentais.....	23
Tabela 5. Avaliação dos efeitos dos diferentes tratamentos estudados a nível sérico, hepático e fecal.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
Apo B-100	Apolipoproteína B-100
Apo E	Apolipoproteína E
AST	Aspartato aminotransferase
CETP	Proteína transportadora de ésteres de colesterol
CYP7A-1	Colesterol 7- α hidroxilase
HDL-C	Lipoproteína de alta densidade - colesterol
HMG CoA	3 - Hidróxi - 3 - metilglutaril - Coenzima A
HMG CoAr	3 - Hidróxi - 3 - metilglutaril - CoA redutase
LDL-C	Lipoproteína de baixa densidade - colesterol
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SREBP-1c	Proteína ligante do elemento regulatório de esterol - 1c
SREBP-2	Proteína ligante do elemento regulatório de esterol - 2
VLDL-C	Lipoproteína de muito baixa densidade - colesterol

SUMÁRIO

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Características estruturais e ação hipocolesterolêmica da globulina 11S de leguminosas...	15
1.2. Ação das proteínas de leguminosas no metabolismo lipídico.....	17
1.3. Grão de bico: aspectos econômicos e características do grão.....	19
1.4. Evidências da ação do grão de bico no metabolismo lipídico.....	20
1.5. Hiperlipidemia.....	22
1.6. Tratamento farmacológico na hiperlipidemia.....	23
1.7. Tratamento dietético da hiperlipidemia.....	25
1.8. Homologia entre as globulinas 11S.....	27
2. OBJETIVOS.....	29
2.1. Objetivo geral.....	29
2.2. Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. Material.....	30
3.1.1. Preparo do material.....	30
3.1.2. Isolamento da proteína.....	30
3.2. MÉTODOS.....	31
3.2.1. Determinação da proteína.....	31
3.2.2. Cromatografia de filtração em gel- Sepharose CL 6B.....	32
3.2.3. Caracterização eletroforética por técnica SDS-PAGE.....	32
3.3. Protocolo experimental.....	33
3.3.1. Animais e condições experimentais.....	33
3.3.2. Elaboração de dietas experimentais.....	34
3.3.3. Protocolo experimental.....	34
3.3.4. Crescimento ponderal, consumo alimentar e excreção fecal.....	37
3.3.5. Coleta do material biológico e análises bioquímicas séricas.....	37
3.3.6. Análises do tecido hepático.....	37
3.3.7. Análise da excreção fecal.....	38
3.3.8. Análise estatística.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1. Análise da composição química da farinha de grão de bico.....	39
4.2. Determinação do rendimento da fração 11S.....	40
4.3. Perfil da cromatografia de filtração em gel - Sepharose CL 6B.....	40
4.4. SDS Page da proteína legumina (11S).....	42

4.5. Dietas experimentais, peso corpóreo, consumo alimentar e excreção fecal.....	44
4.6. Peso do fígado e índice hepatossomático.....	46
4.7. Lipídeos e lipoproteínas plasmáticas.....	50
4.8. Lipídeos hepáticos.....	62
4.9. Lipídeos fecais.....	65
5. <i>CONCLUSÕES</i>	68
6. <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	69

Capítulo II

ARTIGO: Efeito potencial da fração proteica 11S do grão de bico (*Cicer arietinum* L.) na hiperlipidemia: estudo em modelo animal.

INTRODUÇÃO

1.1. Características estruturais e ação hipocolesterolêmica da globulina 11S de leguminosas

As globulinas representam de 50 a 70% do conteúdo proteico das leguminosas e apresentam duas frações proteicas distintas, uma do tipo legumina (11S) e outra do tipo vicilina (7S) que são classificadas de acordo com seus coeficientes de sedimentação em ultracentrífuga. (LIU, 2007; SILVA et al 2001; DURANTI, GIUS, 1997; SHEWRY, NAPIER, TATHAM, 1995). A globulina 11S é um hexâmero, possui estrutura quaternária onde cada subunidade contém um polipeptídeo ácido e um polipeptídeo básico ligados por pontes dissulfeto, com massas moleculares de 40 kDa e 20 kDa, respectivamente. (DURANTI, GIUS, 1997; SHEWRY, NAPIER, TATHAM, 1995). Essas proteínas têm sido caracterizadas em inúmeros trabalhos, particularmente envolvendo a soja.

Estudos *in vitro* e *in vivo* realizados com as frações 7S e 11S da soja têm demonstrando uma relação positiva quanto ao metabolismo lipídico (FASSINI et al. 2011; FERREIRA et al. 2011; LOVATI, MANZONI, PIZZAGALLI, 2008; PAK et al., 2005; DURANTI et al. 2004; FUKUI, KOJIMA, TACHIBANA, 2004, 2002; LOVATI, MANZONI, CORSINI, 1992). Lovati, Manzoni, Corsini (1992) demonstraram uma redução na concentração de colesterol plasmático de 34,84% e 32,70% respectivamente, após a administração das globulinas 7S e 11S em ratos Sprague-Dawley alimentados com dieta hipercolesterolêmica. Wright e Salter (1998) sugeriram que a redução nos níveis de colesterol total e a ligação com sais biliares apresentam-se aumentadas pela presença de peptídeos com predomínio de

aminoácidos hidrofóbicos resultantes da hidrólise das frações 11S e 7S da soja. Este fato também foi relatado por Pak et al. (2005) ao verificar a atividade hipocolesterolemiantes de peptídeos isolados a partir da hidrólise da glicinina da soja.

Ferreira et al. (2011) verificaram a ação da fração β -conglucina (7S) da soja em diferentes concentrações (200 e 300 mg/kg de peso corpóreo) em animais alimentados com dieta hipercolesterolêmica. Observou-se uma diminuição nos níveis plasmáticos de colesterol total e triglicerídeos de 11% e 25% respectivamente, quando administrado 200 mg/kg da fração 7S e 23% e 34% quando a dosagem administrada foi alterada para 300 mg/kg de 7S. Houve também um aumento de 32,5% e 56,9% nos níveis de HDL- C, uma diminuição de 21% no colesterol total e triglicerídeos hepáticos, além da diminuição do índice aterogênico em 40,2% e 56,4% em relação ao grupo hipercolesterolêmico.

Fassini et al. (2011, 2012) observaram o efeito da fração glicinina (11S) da soja em ratos alimentados com dieta acrescida de 1% de colesterol e 0,5% de ácido fólico. Houve redução de aproximadamente 23% nos níveis de triglicerídeos plasmáticos e 20,9% nos triglicerídeos hepáticos, 19,88% nas frações não-HDL-C e 42,2% no índice aterogênico, porém não foi observada nenhuma alteração no colesterol total hepático. Foi verificado um aumento de 26,8% nos níveis de HDL-C do grupo que recebeu administração de 300 mg/kg de 11S de soja diariamente durante a realização do experimento, sugerindo que esta proteína desempenha uma ação protetora quanto ao risco de desenvolvimento de doenças aterogênicas.

TAVANO et al. (2008) mostraram em um estudo de caracterização da proteína do grão de bico que a classe globulínica (47,85%) representa a fração proteica majoritária do grão, seguida das frações de albumina (18,63%), glutelina (10,02%) e prolamina (0,17%). No grão de bico, a fração proteica do tipo legumina

(11S) representa a principal proteína do grão semelhante às espécies de sojas e diferentes da maioria dos feijões, lentilha e ervilha onde as frações proteicas vicilinas (7S) são majoritárias (DERBYSHIRE, WRIGHT, BOULTER, 1976). A proteína 11S no grão de bico constitui aproximadamente 11% no conteúdo protéico total da farinha o que representa cerca de 81% da globulina total (TAVANO, 2002). Neves, Silva e Lourenço (2004) em um estudo de caracterização e hidrólise *in vitro* da globulina 11S do grão de bico observaram que esta proteína possui peso molecular de aproximadamente 325 kDa, com subunidades com peso molecular entre 35,3 e 55 kDa.

1.2. Ação das proteínas de leguminosas no metabolismo lipídico

O reconhecimento pela U.S Food and Drug Administration (FDA), que considerou o consumo de 25g de proteína de soja por dia como promotor de um efeito preventivo na incidência de doenças coronarianas, em parte devido à significativa redução plasmática do colesterol total e da lipoproteína LDL-C (LOVATI, MANZONI, PIZZAGALLI, 2008; ZHONG et al., 2007; DURANTI et al., 2004) abriu uma nova perspectiva para estudos com outras leguminosas que também poderiam atuar como compostos funcionais de alimentos.

Boualga et al. (2009) observaram em ratos jovens alimentados com proteína isolada da lentilha como fonte protéica que não houve alteração significativa no colesterol total plasmático dos animais, no entanto, os níveis de triglicerídeos séricos e hepáticos foram reduzidos em 57,6 e 50,0% respectivamente. Resultado semelhante foi observado por Spielmann, Stangl e Eder (2008), que ao oferecerem proteína isolada de ervilha a ratos por um período de 16 dias, verificaram que estes

apresentaram menor peso do fígado e menor ganho de peso do que o grupo alimentado com caseína. Não houve diferença nos níveis plasmáticos de colesterol total, LDL-C e HDL-C entre os grupos, porém houve diminuição nas concentrações de colesterol hepático e no colesterol constituinte da VLDL-C seguida de uma maior excreção de ácidos biliares nas fezes, além de uma maior concentração de SREBP-2, HMG CoAr, receptor de LDL-C e CYP7A1, envolvidos no metabolismo e regulação do colesterol.

Rho et al. (2007) verificaram o efeito hipocolesterolêmico do hidrolisado de soja escura em diferentes concentrações em ratos que recebiam dieta acrescida de 1% de colesterol. Menor ganho de peso, tecido adiposo epididimal e peso do fígado, além da redução de 25% do colesterol sérico e de 26 a 60% do LDL-C foram observados em relação ao grupo que recebeu caseína como fonte protéica. Não houve diferença no nível de colesterol hepático, porém os triglicerídeos hepáticos diminuíram em até 10% e o HDL-C aumentou em até duas vezes comparado a caseína, dependendo da concentração do hidrolisado.

Ainda que muitos destes efeitos tenham sido relacionados diretamente à proteína das diferentes fontes de leguminosas, evidências têm apontado que estes estariam associados à presença de peptídeos originados da digestão limitada da proteína pelas enzimas gastrointestinais, que após absorção e transporte para o fígado poderiam modular a homeostase do colesterol (SCARAFONI, MAGNI, DURANTI, 2007; LOVATI, MANZONI, PIZZAGALLI, 1992). Os estudos de Rho et al., (2007) e Kahlon, Shao (2004) indicam que a redução plasmática de colesterol seria uma consequência da interação entre os peptídeos formados e o colesterol, ou seus metabólitos, esteróis neutros e sais biliares, promovendo sua excreção. E outros autores sugerem ainda que a composição de aminoácidos das proteínas da dieta

pode ser um dos fatores (LOVATI, MANZONI, PIZZAGALLI, 2008; FUKUI, KOJIMA, TACHIBANA, 2004,2002; MORIYAMA, KISHIMOTO, NAGAI, 2004; ADAMS, GOLDEN, ANTHONY, 2002).

1.3. Grão de bico: aspectos econômicos e características do grão

O grão de bico é um grão pertencente à família das leguminosas *Fabaceae Leguminosae*, do gênero *Cicer* que possui cerca de 39 espécies conhecidas. Sua provável origem se deu no Oriente Médio a aproximadamente 7450 anos e seu cultivo é realizado em várias partes do mundo, sendo que as regiões semi-áridas e o clima da Europa, Ásia, Austrália e América do Norte oferecem as melhores condições (ROY, BOYE, SIMPSON, 2010; CHANG et al., 2009; SINGH, 1997; CHAVAN et al.,1986)

Em 2003, a produção atingiu 7,1 milhões de toneladas, em 2004, seu cultivo em 45 países produziu 8,6 milhões de toneladas e em 2008, a produção chegou a 9 milhões de toneladas, sendo que somente na Índia foram produzidas 5,97 milhões de toneladas deste grão, o que corresponde a 66% da produção mundial. O Paquistão é o segundo maior produtor, responsável por cerca de 7% do cultivo mundial, seguido pela Turquia, Austrália e Iran. O crescimento da produção mundial do grão de bico é favorecido pelo seu custo relativamente baixo, seu valor nutricional e a digestibilidade da proteína, baixa quantidade de fatores antinutricionais e suas propriedades funcionais empregadas na indústria de alimentos (ROY, BOYE, SIMPSON, 2010; WANG et al., 2010; CHANG et al., 2009; EMAMI, TABIL, 2002).

Desi e Kabuli são os dois tipos de grão de bico disponíveis no comércio mundial, sendo agrupados de acordo com a coloração de suas sementes e

distribuição geográfica. O grão de bico desi é uma semente pequena, escura, com camada de formato irregular e superfície áspera, com origem no Mediterrâneo e Oriente Médio, desenvolvendo-se em solos semi-áridos. O tipo Kabuli possui semente arredondada, mais larga que a do tipo desi, de cor clara, superfície lisa, possui origem indiana e se desenvolve em regiões temperadas (ROY, BOYE, SIMPSON, 2010; KHALIL et al, 2007; EMAMI, TABIL, 2002; TAVANO, 2002; SINGH, 1997; GIL et al, 1996).

A semente de grão de bico é constituída por 52,4 a 70,9% de carboidratos, principalmente na forma de amido, 6,4% de lipídeos, predominando a fração insaturada (aproximadamente 67,13% do total de lipídeos), cerca de 22% de proteínas, além de ser uma boa fonte de fibras solúveis e insolúveis, vitaminas, minerais como cálcio, fósforo, ferro, zinco, cobre, potássio, magnésio e também possui baixo teor de sódio (ROY, BOYE, SIMPSON, 2010; KHALIL et al, 2007; EMAMI, TABIL, 2002).

1.4. Evidências da ação do grão de bico no metabolismo lipídico

Zulet, Martínéz (1995) conduziram um estudo com ratos hipercolesterolêmicos alimentados com grão de bico, sendo observada uma redução de 54% nos níveis plasmáticos de colesterol total e LDL-C, 70% nos triglicerídeos e VLDL-C, 27,5% no HDL-C e de 36% na razão colesterol total/HDL-C. Pittway, Robertson, Ball (2008) realizaram um estudo em que 45 indivíduos saudáveis incorporaram grão de bico em sua dieta por 12 semanas e após este período verificou-se alteração nos níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos, HDL-C e insulina, refletindo na melhora do perfil lipídico e a resistência à insulina dos participantes.

Estes dois estudos (ZULET & MARTINÉZ, 1995; PITTMWAY, ROBERTSON, BALL, 2008) demonstraram uma possível ação do grão de bico no metabolismo lipídico, porém nestes casos o grão foi usado na sua totalidade, o que considera não só a ação protéica, mas também a de outros compostos como saponinas (CARR; JESCH, 2006; MILGATE; ROBERTS, 1995), gorduras insaturadas (PITTMWAY, ROBERTSON, BALL, 2008), fibras (CHEN, JIAO, MA, 2008; PITTMWAY, ROBERTSON, BALL, 2008; CARR; JESCH, 2006) isoflavonas e esteróis (CHEN, JIAO, MA, 2008; CARR; JESCH, 2006; YU; MCGONIGLE, 2005) que são constituintes do grão e que também são conhecidos por desempenharem algum efeito sobre as concentrações lipídicas séricas.

Yang et al (2007) demonstrou que ratos hipercolesterolêmicos induzidos por dieta constituída de 20% de gordura e 1% de colesterol apresentaram alteração na composição corporal quando tratados com 10% de farinha integral de grão de bico durante 32 semanas, comparado com os animais que receberam caseína. O grupo alimentado com o grão mostrou uma redução de 14,1% no ganho de peso e de 28% na relação peso corpóreo: gordura epididimal. Essa mesma intervenção influenciou ainda os níveis de lipídeos plasmáticos com a diminuição do LDL-C em 23%, 30% na razão LDL-C:HDL-C, 45% de triglicerídeos e o aumento de 35% de HDL-C, seguidos de uma maior atividade das enzimas lipase lipoproteica e lipase hepática envolvidas com o metabolismo de lipoproteínas. Houve uma melhora significativa em relação à resistência à insulina e prevenção da hiperglicemia e hiperinsulinemia pós prandiais. Os autores deste estudo sugeriram que estes efeitos podem estar associados a diminuição da gordura visceral e ao alto teor de ácidos graxos insaturados (principalmente ácido oléico e linolênico) presente no grão de bico, que modificariam a composição corporal e de lipídeos plasmáticos.

Análises realizadas por Boualga et al. (2009) ao utilizar o isolado proteico do grão de bico em um grupo de ratos alimentados com dieta isoenergética mostraram uma diminuição de 31,38% nos níveis hepáticos de colesterol e de 31,17% nos triglicerídeos, 46,46% nos triglicerídeos plasmáticos, além de uma redução de 17,26% no peso corporal e de 17,28% no tecido epididimal e da atividade da lipoproteína lípase em relação ao grupo controle, alimentado com caseína. O peso total do VLDL-C representado pela quantidade de apo B-100 e outros componentes lipídicos como triglicerídeos, fosfolídeos, colesterol não esterificado e éster de colesterol presentes nessa lipoproteína sofreu uma redução de 46,5%, refletindo uma diminuição de 33% de éster de colesterol, 56% de apolipoproteína, 44% dos fosfolídeos e 63,33% dos triglicerídeos.

1.5. Hiperlipidemia

As lipoproteínas auxiliam na homeostase do colesterol endógeno e exógeno no organismo por atuarem no transporte lipídico. Quando algum dos mecanismos envolvidos nesse processo se torna deficiente produzindo uma desordem no metabolismo das lipoproteínas, esta é caracterizada como hiperlipidemia (CHARLTON-MENYS, DURRINGTON, 2007; GENEST, 2003; KNOOP, 1999).

Existem cinco tipos principais de hiperlipidemia: a *hipertrigliceridemia*, na qual há uma diminuição na remoção de triglicerídeos séricos pela redução da atividade da lipoproteína lípase, seguido de um aumento da secreção hepática de VLDL-C. A *hiperlipidemia combinada*, caracterizada pelo acúmulo sérico de VLDL-C, LDL-C ou ambos devido a uma produção excessiva de VLDL-C ou por um bloqueio na degradação da LDL-C. A *doença de remoção de remanescentes* ou

disbetalipoproteneimia familiar conhecida pelo aumento da secreção de VLDL-C e comprometimento da remoção de remanescentes de lipoproteínas causado por uma deficiência na apo E. *Hipercolesterolemia*, na qual há uma redução da atividade e ou na síntese do receptor de LDL-C gerando um aumento dos níveis desta lipoproteína. Além da *hipoalfalipoproteinemia familiar* em que há uma diminuição na formação e um maior catabolismo das apolipoproteínas AI e AII decorrente do aumento na atividade da lipase hepática e da CETP, levando a uma diminuição do HDL-C (CHARLTON-MENYS, DURRINGTON, 2007; GENEST, 2003; KNOOP, 1999).

A ocorrência de algum destes tipos de hiperlipidemia associada a fatores de risco para doenças cardiovasculares e baixas concentrações de HDL plasmático favorecem a doença cardiovascular aguda (CHEN et al., 2008; GENEST, 2003). A prevenção e tratamento neste caso buscam modificar ou mesmo eliminar os fatores de risco, conciliando, se necessário, com o tratamento específico para a hiperlipidemia (KNOOP, 1999).

1.6. Tratamento farmacológico na hiperlipidemia

Os medicamentos utilizados na regulação do metabolismo lipídico são divididos em dois grupos: as estatinas, inibidores de absorção do colesterol, sequestradores de ácidos biliares e ácido nicotínico são usados na redução de LDL-C e colesterol total, enquanto que os fibratos e ácidos graxos ômega-3 atuam na redução dos triglicerídeos (DREXEL, 2009).

Os mecanismos de ação destas drogas agem em locais específicos do transporte lipídico e dependendo da necessidade podem ser prescritas em

associação uma com as outras. As estatinas diminuem a síntese de colesterol e a secreção de VLDL-C devido ao aumento da atividade do receptor de LDL-C e inibição da HMG-CoAr. Os sequestrantes de ácidos biliares interrompem a circulação êntero-hepática destes, aumentando a conversão do colesterol hepático em ácidos biliares. O ácido nicotínico diminui a síntese hepática de triglicérides, a secreção de VLDL-C e a conversão desta em LDL-C, além de aumentar HDL-C. Os fibratos reduzem a secreção de VLDL-C e aumentam a atividade da lipoproteína lipase, aumentando a remoção de triglicérides (DREXEL, 2009; SCHULS, 2006; SCHACHTER, 2004; STANCU, SIMA, 2001; KNOPP, 1999).

Dentre as possibilidades de tratamento, as estatinas tem sido o grupo de drogas mais empregado devido a eficiência de seus resultados. A fermentação fúngica foi a primeira forma de obtenção das estatinas, caso da lovastatina, pravastatina e sinvastatina, e em seguida foram produzidas sinteticamente as fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina e a cerivastatina que foi retirada do mercado mundial em 2001 pela ocorrência de rabdomiólise (lise rápida no músculo esquelético). Apesar das estatinas apresentarem o mesmo mecanismo de ação, elas diferem quanto à estrutura química, perfil fármaco-cinético e eficácia na modificação das frações lipídicas (COSTA-SCHARPLATZ et al., 2008, SCHACHTER, 2004).

O mecanismo de ação das estatinas se baseia na inibição competitiva da enzima HMG-CoAr, impedindo a conversão de HMG-CoA em mevalonato e consequentemente a formação de colesterol no fígado. A diminuição do colesterol intracelular induz a uma ativação do fator de transcrição SREBP-2 (proteína-2 ligante do elemento regulatório de colesterol) que aumenta a expressão gênica do receptor de LDL-C na superfície do hepatócito, aumentando a captação de LDL-C

sérico e reduzindo assim a concentração de LDL-C circulante (SCHACHTER, 2004; STANCU, SIMAS; 2001; KNOPP, 1999).

Além da inibição da HMG-CoAr, as estatinas têm apresentado mecanismos secundários que também beneficiam o tratamento das doenças cardiovasculares. Elas podem inibir a síntese hepática de Apo B100 e reduzir a síntese e secreção de VLDL-C melhorando o perfil lipídico sérico e também atuar na diminuição do processo inflamatório, restauração da atividade plaquetária e processo de coagulação, no aumento da estabilidade de placas ateroscleróticas, podendo também inibir o crescimento de células tumorais e aumentar a mobilização de cálcio intracelular (SCHULS, 2006; SCHACHTER, 2004; STANCU, SIMAS, 2001). Muitos destes efeitos pleiotrópicos parecem ser mediados pela inibição da produção de isoprenóides, compostos derivados do mevalonato, que servem como ligantes lipídicos de moléculas sinalizadoras intracelulares (SCHACHTER, 2004).

Mesmo apresentando bons resultados frente ao tratamento da hiperlipidemia, as estatinas podem causar efeitos adversos em alguns pacientes, sendo os mais comuns: erupção cutânea, perda de concentração ou distúrbios do sono, desconforto gastrointestinal, dores musculares, fraqueza e em casos mais graves rabdomiólise, hepatite que pode estar associada com perda de apetite e de peso e aumento das aminotransferases séricas. Há casos de miopatia e hepatotoxicidade, porém estes são mais raros (KNOPP, 1999).

1.7.Tratamento dietético da hiperlipidemia

Mudanças no estilo de vida e reeducação alimentar são algumas das recomendações da comissão de nutrição da American Heart Association visando

reduzir os riscos de doenças cardiovasculares. Além da adequação do peso, manutenção dos níveis séricos do LDL-C, HDL-C e triglicerídeos, prática de atividade física e exposição mínima ao tabaco, propõe-se a adequação da dieta através do maior consumo de vegetais, frutas, grãos inteiros, alimentos com alto teor de fibras e peixes, limitando o consumo de gorduras saturadas, gorduras trans e colesterol, alimentos com excesso de açúcar ou sal e bebidas alcoólicas (SIRTORI et.al., 2008; KRIS-ETHERTON; HARRIS; APPEL, 2002). Varady e Jones (2005) verificaram que dietas restritas em gorduras saturadas combinadas a exercícios físicos diminuíram 7 a 18% do colesterol total, 7 a 15% do LDL-C e 4 a 18% do nível dos triglicerídeos, além de aumentar o HDL-C de 5 a 14%.

O consumo de grãos de leguminosas também tem sido frequentemente associado a diversos benefícios associados à prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares em função da sua composição de nutrientes e as recentes pesquisas com compostos bioativos (ROY, BOYE, SIMPSON, 2010; DURANTI, 2005; KRIS-ETHERTON; HARRIS; APPEL, 2002; YOSHIKAWA et al., 2000). Dentre as leguminosas, a soja se encontra em lugar de destaque devido aos resultados obtidos em muitas pesquisas clínicas (ROSELL et al., 2004; TONSTAD, SMERUD, HOIE, 2002), em animais (DURANTI et al., 2004; AOYAMA et al., 2000) e meta-análises (REYNOLDS, CHIN, LEES, 2006; ANDERSON, JOHNSTONE, COOK-NEWELL, 1995) relacionados à redução sérica de colesterol total e triglicerídeos.

1.8. Homologia entre as globulinas 11S

Marcone (1999) e Marcone et al. (1998a,b) em um estudo de caracterização de 21 globulinas purificadas de sementes de plantas mono e dicotiledôneas observaram que as frações globulínicas 11S apresentaram peso molecular, composição de subunidades e conformação interna semelhantes em plantas mono e dicotiledôneas, com diferenças somente nas propriedades de superfície que possivelmente deve ter decorrido da propensão da ocorrência de maior frequência de substituição de aminoácidos na superfície dessas proteínas. O peso molecular das subunidades das 11S destas plantas variou entre 20 e 27 KDa para as subunidades básicas e 30 a 39 KDa para as subunidades ácidas, sendo que as subunidades das globulinas 11S geralmente apresentaram-se ligadas por forças não covalentes, com exceção das dicotiledôneas que apresentaram algumas ligações dissulfeto entre suas subunidades. Observou-se também a semelhança quanto à composição dos aminoácidos ácido glutâmico, ácido aspártico, asparagina e arginina que podem estar relacionados a uma equivalência entre as proteínas de reserva, além da similaridade nas quantidades de estruturas α -hélice e folhas β nas estruturas secundárias destas globulinas, indicando uma conformação interna muito semelhante ou altamente conservada. Acredita-se que todas as semelhanças das características estruturais e químicas das globulinas 11S podem ter surgido de uma evolução convergente em resposta a uma mesma necessidade funcional ou mesmo a um ancestral comum.

Assim, baseado no efeito hipocolesterolêmico das leguminosas, mais especificamente da 11S da soja (FASSINI et al. (2011, 2012); PAK et al., 2005; KWON et al., 2002), nos estudos de similaridades encontradas entre as globulinas

11S (MARCONE, 1999; MARCONE et al.,(1998 a,b)) e nos potenciais efeitos hipolipidêmicos apresentados pelo grão de bico (BOUALGA et al. 2009; PITTWAY, ROBERTSON, BALL, 2008; YANG et al., 2007; ZULLET & MARTINÉZ; 1995), a verificação da ação da proteína 11S do grão de bico frente a este quadro abriria mais uma perspectiva à utilização de grãos de leguminosas, particularmente a do grão de bico como alimento funcional.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar a ação da fração proteica 11S do grão de bico administrada oralmente como suplemento em animais hipercolesterolêmicos induzidos pela dieta.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar a fração 11S a partir da globulina total;
- Induzir hipercolesterolemia nos animais a partir de uma dieta acrescida de 20% de gordura de coco hidrogenada, 1% de colesterol e 0,5% de ácido cólico.
- Avaliar os efeitos da administração da fração 11S nas concentrações séricas de colesterol total, fração HDL-C e não-HDL-C e triglicerídeos comparados a animais que não receberam a fração proteica;
- Avaliar os efeitos da administração da fração 11S nas concentrações de colesterol total e triglicerídeos a nível hepático e colesterol e lipídeos totais nas fezes de animais que não receberam a fração proteica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Foram utilizadas sementes de grão de bico (*Cicer arietinum L.*) provenientes do comércio de Araraquara-SP.

3.1.1. Preparo do material

As sementes íntegras foram limpas e maceradas em água destilada a 4°C por um período de 12 horas. Posteriormente, foram removidas as cascas manualmente e os cotilédones levados à estufa com circulação de ar a 40°C para secagem. Os cotilédones secos foram moídos e tamisados até a passagem em peneira de granulação de 60 mesh.

A farinha foi desengordurada na proporção 1:8 m/v de n-hexano durante 4 horas à temperatura ambiente sob agitação. Esse conteúdo foi filtrado e seco à temperatura ambiente para retirada do solvente. Foi realizada análise da composição química das farinhas integral e desengordurada de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Association Official Analytical Chemistry (AOAC, 1998).

3.1.2. Isolamento da proteína

O isolamento da globulina total e da fração 11S a partir da farinha desengordurada teve como princípio básico a diferença de solubilidade das proteínas em sal. A globulina principal foi obtida a partir da globulina total extraída da farinha desengordurada segundo KUMAR & VENKATARAMAN (1980) com algumas modificações.

Alíquotas de farinha de grão de bico desengordurada foram suspensas em solução de cloreto de sódio 10%, na relação de 1:10 (m:v), sob agitação leve por 2 horas a 4°C. O material foi centrifugado a 5000 rpm por 30 minutos, o sobrenadante foi diluído 10 vezes em água destilada de acordo com seu volume e mantido em repouso por 12 horas. Após este período, foi novamente levado à centrifugação a 5000 rpm por 30 minutos e o precipitado coletado, solubilizado em solução de NaCl 10%, diluído 20 vezes em seu volume com água destilada e mantido por mais 12 horas em repouso. O precipitado separado por centrifugação a 5000 rpm por 30 minutos e solubilizado em quantidade mínima de NaCl 10%, representando a fração proteica 11S do grão de bico.

Para fins de uso em experimento biológico a fração proteica 11S obtida pela extração acima mencionada foi mais uma vez diluída em água destilada 20 vezes em seu volume, centrifugada a 5000 rpm por 30 minutos e ressuspensa em solução salina (NaCl 0,9%).

3.2. Métodos

3.2.1. Determinação da proteína

Nas etapas de obtenção da proteína total e 11S isolada do grão foi realizada a determinação da proteína pelo método de Lowry (1951), através da leitura a 750 nm em espectrofotômetro, marca Pharmacia Biotech, e uso de curva analítica utilizando albumina de soro bovino como proteína padrão. No eluato da coluna cromatográfica Sepharose CL 6B a proteína foi monitorada pela leitura a 280 nm.

3.2.2. Cromatografia de filtração em gel - Sepharose CL 6B

Antes da aplicação da fração proteica na coluna, foi realizada a passagem de Blue Dextrana a fim de determinar o seu V_0 . A leitura em absorbância foi realizada a 650 nm e verificado o pico no tubo de número 38, com volume de eluição de 232,7 mL. Assim, estabeleceu-se o V_0 da coluna.

Após a extração e isolamento da fração 11S do grão de bico, esta foi aplicada em coluna contendo resina Sepharose CL-6B (100 x 2,5 cm) previamente equilibrada com tampão de corrida fosfato de potássio 10 mmol/L (pH 7,5), contendo 0,5 mol/L de NaCl e 0,01% de azida sódica. O perfil cromatográfico foi traçado por registro de absorbância a 280nm a partir das frações de aproximadamente 5,5 mL coletadas da coluna. O pico cromatográfico referente à fração 11S foi recolhido, armazenado e posteriormente submetido à análise eletroforética.

3.2.3. Caracterização eletroforética por SDS

As proteínas isoladas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS, na presença e ausência de agente redutor 2- mercaptoetanol, em sistema de pH descontínuo, assim como descrito por Laemmli (1970), a fim de se estimar o número e a massa molecular de suas subunidades.

Alíquotas de 10 μ g de proteína foram depositadas nos géis de concentração e separação preparados com 12% e 4,5% de acrilamida, respectivamente. As amostras proteína total, fração 11S isolada, pico cromatográfico da coluna Sepharose e o padrão de peso molecular foram dissociados em tampão contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) a 2% e 1% de β -mercaptoetanol, aquecidas por 5 minutos à fervura (100°C), resfriadas e aplicadas no gel. O padrão de peso molecular foi constituído por proteínas com pesos moleculares conhecidos, sendo

elas a fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

A produção dos géis ocorreu em placa de vidro de 10,0 x 10,6 cm e a corrida eletroforética ocorreu em cubas de acrílico com tampão Tris/glicina (pH 8,3) contendo 0,1% de SDS. A voltagem inicial foi de 100 V até o corante atingir o gel de separação, em seguida houve alteração da corrente para 150 V, mantendo-a constante até o final da corrida, por cerca de 3 horas.

A coloração do gel se deu por imersão em solução Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,25% em ácido acético: metanol: água destilada durante 2 horas e descorada em solução de ácido acético, metanol e água (proporção 1,5:1:17,5, respectivamente).

3.3. Protocolo experimental

3.3.1. Animais e condições experimentais

Foram utilizados 36 ratos da linhagem *Wistar*, machos adultos-jovens (*Rattus norvegicus* var. *Albinus*), com idade entre 21 e 28 dias de vida, peso médio de 60 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu.

Durante o período de adaptação e ganho de peso até que os animais atingissem o peso inicial ideal para o experimento (180 a 200 gramas), estes foram alocados em gaiolas coletivas, no local do experimento, à temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo de claro-escuro de 12 horas, recebendo ração comercial

Purina® e água *ad libitum*, respeitando todos os protocolos estabelecidos pelo *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 1985).

3.3.2. Elaboração das dietas experimentais

As dietas foram elaboradas conforme especificações do American Institute of Nutrition - (AIN-93G) e descrito por Reeves et al. (1993). Os grupos controle e experimental receberam a composição da dieta indicada na Tabela 1, sendo que a dieta do grupo experimental foi acrescida de 1% de colesterol, 0,5% de ácido cólico e substituída a fonte lipídica por 20% de óleo de coco hidrogenado (NATH et al. 1959).

3.3.3. Protocolo experimental

Após o período de adaptação, os ratos foram divididos em 4 grupos ($n=9$) de maneira casualizada de acordo com o peso e mantidos em gaiolas individuais. Os grupos experimentais foram divididos em: Grupo Controle (STD) que recebeu uma dieta purificada baseada nas recomendações AIN-93G para ratos; Grupo Hipercolesterolêmico (HC) que recebeu uma dieta nas mesmas condições do STD com a incorporação de 20% de gordura de coco total hidrogenada, 1% de colesterol e 0,5% de ácido cólico; Grupo Grão-de-bico (HC+GB) recebeu a dieta HC e foi tratado com uma dose de 300mg/Kg/dia de peso corpóreo da fração 11S isolada do grão-de-bico; Grupo Sinvastatina (HC+SVT) que foi alimentado com a dieta HC e tratado com 50 mg/Kg/dia de peso corpóreo com o fármaco Sinvastatina comercial. A administração da fração proteica e da droga foi realizada diariamente por

gavagem considerando o peso corpóreo dos animais durante os 28 dias do experimento em horários pré-determinados, respectivamente, às 9 horas e 14 horas.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais.

INGREDIENTE	STD	HC	HC + 11S	HC + SVT
Caseína	20,00	20,00	20,00	20,00
Amido	39,75	11,75	11,75	11,75
Dextrina	13,20	13,20	13,20	13,20
Sacarose	10,00	10,00	10,00	10,00
Óleo de soja	7,00	--	--	--
Óleo de coco hidrogenado	--	20,00	20,00	20,00
Celulose	5,00	5,00	5,00	5,00
Mistura mineral	3,50	3,50	3,50	3,50
Mistura vitamínica	1,00	1,00	1,00	1,00
L-Cistina	0,30	0,30	0,30	0,30
Birtarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Colesterol	--	10,00	10,00	10,00
Ácido cólico	--	5,00	5,00	5,00
Tratamento (mg/kg/dia)				
Fração 11S isolada grão de bico	--	--	300,00	--
Sinvastatina	--	--	--	50,00

STD: grupo controle; HC: grupo hipercolesterolêmico; HC + 11S: grupo 11S grão de bico (300 mg/kg peso corpóreo/dia); HC + SVT: grupo sinvastatina (50 mg/kg peso corpóreo/dia).

3.3.4. Crescimento ponderal, consumo alimentar e excreção fecal

O crescimento dos animais foi avaliado a cada dois dias, através de pesagem corporal em balança semi-analítica. A ingestão foi determinada pela diferença do peso da dieta ofertada no dia anterior em relação às sobras. As fezes foram coletadas, secas em estufa à temperatura de 50°C “*overnight*”, armazenadas e conservadas em temperatura de -20 °C para análises posteriores.

3.3.5. Coleta do material biológico e análises bioquímicas séricas

Ao final 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®), e em seguida centrifugado a 1900g por 15 minutos. O soro foi recolhido, armazenado sob congelamento à -20°C, para posteriores análises bioquímicas.

Análises de glicose, colesterol total, HDL-colesterol e triglicérides foram realizadas no soro, por meio de métodos enzimáticos utilizando *kits* enzimáticos comerciais (LabTest, BR). A fração não-HDL-C (LDL-C + VLDL-C) foi calculada pela diferença entre colesterol total e o HDL-C e o índice aterogênico calculado a partir da relação colesterol total/ HDL.

3.3.6. Análises do tecido hepático

Os lipídeos hepáticos total foram quantificados por método gravimétrico proposto por Folch et al. (1957) através da extração com clorofórmio-metanol (2:1 v/v). O colesterol total e triglicérides hepáticos foram extraídos conforme

procedimento descrito por Haug & Hostmark (1987). O colesterol total e triglicerídeos foram quantificados por kits enzimáticos comerciais (LabTest, BR). O índice hepatossomático foi calculado pela relação [(peso do fígado/ peso corpóreo) x 100].

3.3.7. Análise da excreção fecal

Os lipídeos totais e colesterol total das fezes foram extraídos e quantificados de acordo com procedimentos descritos para o órgão hepático de acordo com procedimento descritos por Folch et al. (1957) para lipídeos totais e Haug & Hostmark (1987) para colesterol total.

3.3.8. Análise estatística

Os dados dos tratamentos de cada grupo foram analisados utilizando o software SigmaStat® 3.5 (Dundas software, Germany, 1999). Os resultados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey, para comparação múltipla entre os tratamentos. Todos os resultados foram expressos na forma de média \pm erro padrão (SE), sendo estabelecido um nível de significância $P < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da composição química da farinha de grão de bico

A Tabela 2 apresenta os valores referentes à composição química das farinhas de grão de bico integral e desengordurada utilizadas no presente trabalho.

Tabela 2. Composição química determinada segundo AOAC (1998). Valores representados em média \pm desvio padrão.

Componente	Farinha de grão de bico integral (%)	Farinha de grão de bico desengordurada (%)
Umidade	8,65 \pm 0,13	11,04 \pm 0,30
Proteína	20,54 \pm 0,68	20,61 \pm 0,70
Lipídeos	8,03 \pm 0,19	2,25 \pm 0,14
Cinzas	3,13 \pm 0,15	3,10 \pm 0,02
Carboidrato	59,65	63,00

O processo de desengorduramento da farinha realizado antes da extração da proteína não alterou a composição dos nutrientes presentes no grão de maneira significativa, principalmente em relação à proteína. Sánchez- Vioque et al., (1999) observaram que mesmo utilizando hexano para desengorduramento da farinha de grão de bico, uma pequena parcela de lipídeos (1,5%) não foi totalmente removida, o que sugere que estes lipídeos estejam associados às proteínas, porém não interferiram diretamente nos resultados.

O conteúdo de proteína pode variar de acordo com a espécie, variedade, composição genética, maturidade do grão, condições climáticas, do solo e de crescimento da planta (ROY, BOYE, SIMPSON, 2010; (SINGH, BEJIGA, MALHOTRA, 1990; CHAVAN, KADAM, 1986). O valor médio de proteína encontrado foi de 20,54 \pm 0,68 na farinha integral e de 20,61 \pm 0,70 na farinha desengordurada,

semelhantes aos encontrados por Tavano et al., (2002, 2008); Silva, Neves, Lourenço, (2001), Sánchez- Vioque et al., (1998); Paredes-López, Ordorica-Falomir, Olivares-Vásquez, (1991); Singh, Bejiga, Malhotra, (1990); Sotelo, Flores, Hernández, (1987); Chavan, Kadam (1986); Kumar e Venkataraman (1980).

Os valores encontrados para umidade, cinzas e carboidratos corroboram com os valores encontrados por Withana-Gamage et al., (2011); Silva, Neves, Lourenço, (2001); Sánchez- Vioque et al., (1998);); Paredes-López, Ordorica-Falomir, Olivares-Vásquez, (1991); Chavan, Kadam, (1986).

Assim, em termos de composição centesimal podemos inferir que o grão comercial utilizado nesse estudo é passivo de comparação frente a literatura descrita.

4.2. Determinação do rendimento da fração 11S

Ao final da extração, a fração 11S apresentou um rendimento de 41,68% em relação a proteína total. A partir do cálculo de rendimento sucessivas extrações da proteína 11S foram necessárias para o início do experimento biológico.

4.3. Perfil da cromatografia de filtração em gel - Sepharose CL 6B

A Figura 1 representa o perfil de eluição da fração proteica em coluna Sepharose CL 6B. Foram observados 2 picos, sendo o primeiro eluído no V_0 da coluna e o segundo eluído a um volume de 365 mL. A determinação proteica pelo método de Lowry do primeiro pico indicou uma quantidade inexpressiva de proteína. Já o segundo pico correspondeu à totalidade da proteína aplicada na coluna, o que

foi confirmado em seguida por eletroforese. Entendemos que a leitura da absorbância do primeiro pico ocorreu provavelmente pela presença de algum contaminante absorvido nessa faixa de espectro.

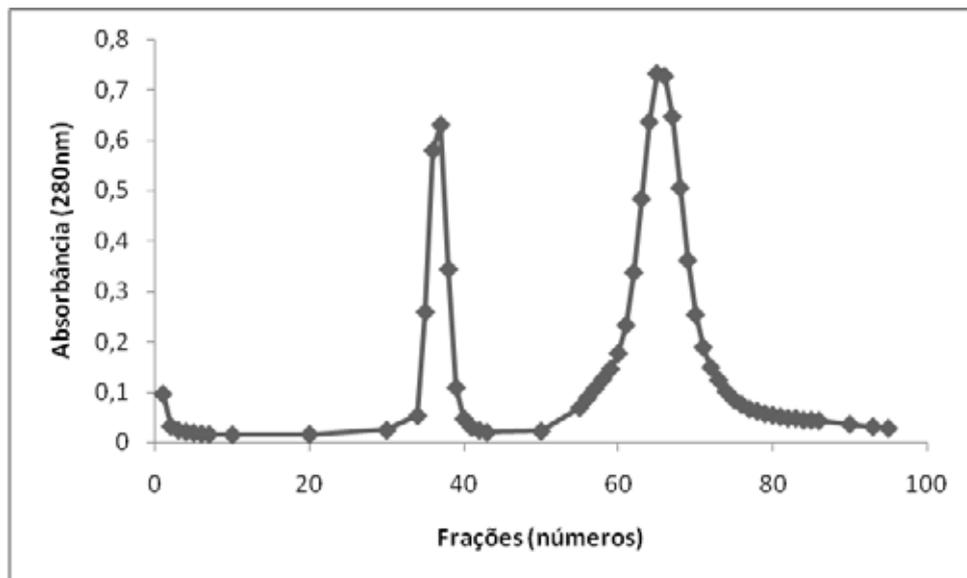


Figura 1: Perfil cromatográfico da 11S de grão de bico em coluna Sepharose CL 6B

Silva, Neves, Lourenço, (2001) em um estudo de caracterização da globulina principal do grão de bico variedade IAC- Marrocos observaram o perfil cromatográfico da 11S em coluna Sepharose CL 6B, verificando a presença de 3 picos. Ao realizar eletroforese identificou-se os picos 1 e 3 como apoteicos por não apresentarem bandas de proteína enquanto que o pico 2 apresentou uma única banda representando uma alta homogeneidade desta proteína, assim como em nosso estudo. Sánchez- Vioque et al., (1999) observando o perfil de eluição de um isolado protéico de grão de bico em coluna Sephadex G-25, verificou o aparecimento de um pico antes da saída da globulina 11S e sugeriu que este tenha ocorrido devido a uma polimerização de proteínas durante a preparação do isolado.

Em um estudo de caracterização de globulinas, Marcone, Kakuda, Yada (1998) estudaram 21 espécies de plantas mono e dicotiledôneas. Ao analisar o perfil cromatográfico dessas globulinas em coluna Sephacril S-300, observou-se que estas apresentaram um pico comum, próximo ao V_0 da coluna, de peso molecular variável, eluído antes do pico da globulina 11S. Mesmo apresentando leitura da absorvância no espectro UV, este material apresentava baixo teor protéico, presença de ácidos nucléicos e outros compostos não identificados com altos pesos moleculares. Estes autores sugerem ainda que este pico pode ser considerado uma forma de identificação da presença de globulinas em preparações protéicas, já que apareceu em todas as amostras estudadas.

4.4. SDS Page da fração proteica do tipo legumina (11S)

A proteína total, globulina 11S e o pico cromatográfico da coluna Sepharose CL 6B foram submetidos à SDS e a partir do padrão de pesos moleculares conhecidos foi possível verificar seus pesos moleculares aproximados.

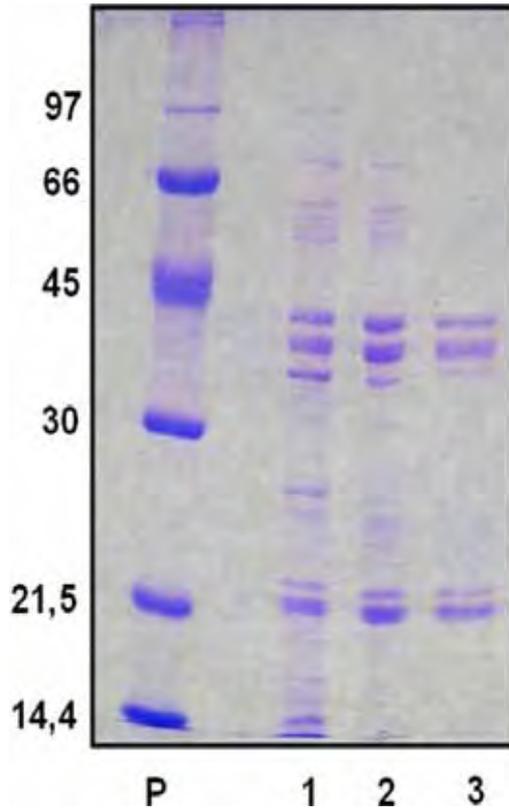


Figura 2. SDS Page da globulina total, globulina 11S isolada e pico cromatográfico da coluna Sepharose CL 6B. P. Padrão, 1. Globulina total do Grão de bico 2. 11S isolada, 3. Tubo pico da 11S cromatografada

A Figura 2 mostra as bandas correspondentes às frações proteicas em eletroforese SDS na presença de agente redutor, sendo possível observar que a medida que o grau de isolamento ia aumentando, mantiveram-se cinco bandas na eletroforese, correspondendo à globulina 11S. Neste estudo não foi observado diferenças significativas entre as eletroforeses na ausência e presença de agente redutor.

Neves, Silva, Lourenço (2004) verificaram a presença de cinco subunidades principais com pesos moleculares entre 55 e 35,3 kDa em SDS na ausência de agente redutor e 4 bandas com pesos moleculares entre 41,2 e 18 kDa em presença de 2-β mercaptoetanol. Estes autores sugerem que a diferença entre as subunidades em condições redutoras e não redutoras ocorre pelo fato de que as

subunidades com 55 e 52,2 KDa é decorrente da constituição destas, que são compostas por 2 ou mais peptídeos unidos por ligação dissulfeto.

Kumar e Venkataraman (1980) visualizaram a presença de cinco bandas no isolado protéico da globulina principal (11S) do grão de bico em SDS Page, com pesos moleculares variando entre 23 a 98 KDa. As bandas de pesos moleculares de 23, 32 e 35 KDa podem ser consideradas como sendo características de proteínas de reserva, enquanto que as subunidades de 52 e 98 KDa podem representar artefatos produzidos pela formação de pontes dissulfeto entre os grupos sulfidril resultantes da exposição à agentes redutores que rompem as estruturas secundárias e terciárias destas globulinas (DERBYSHIRE; WRIGHT; BOULTER, 1976).

4.5. Dietas experimentais, peso corpóreo, consumo alimentar e excreção fecal

A administração de 300 mg/kg peso corpóreo da proteína 11S por gavagem resultou em uma pequena adição (2,05%) do consumo proteico da dieta, não influenciando a relação de ingesta e ganho de peso. Dessa forma, entendemos que os resultados alcançados podem ser considerados como os de um composto funcional, assim como observado por Fassini et al. (2011) e Ferreira et al. (2011) ao administrarem respectivamente, globulinas 11S e 7S isoladas e na mesma proporção em ratos hipercolesterolêmicos. A Tabela 3 mostra os valores referentes ao ganho de peso e consumo alimentar.

Tabela 3: Peso corporal, ganho de peso, consumo alimentar e excreção dos grupos experimentais.

	Dieta Hiperlipidêmica		
	STD	HC	11S
Peso inicial (g/rato)	184,30 ± 3,73	183,80 ± 3,87	177,99 ± 4,02
Peso final (g/rato)	351,00 ± 3,48 ^{ab}	372,50 ± 6,32 ^a	330,13 ± 10,15 ^b
Ganho de peso (g/rato/dia)	5,88 ± 0,08 ^b	6,79 ± 0,23 ^a	5,43 ± 0,28 ^b
Consumo alimentar (g/rato/dia)	18,92 ± 0,31 ^a	18,19 ± 0,47 ^a	19,52 ± 0,46 ^a
Excreção fecal (g/rato/dia)	1,43 ± 0,04 ^b	1,60 ± 0,04 ^c	1,99 ± 0,04 ^a
			SVT
			182,1 ± 3,62
			327,87 ± 6,9 ^b
			5,26 ± 0,19 ^b
			15,66 ± 0,45 ^b
			1,56 ± 0,05 ^{bc}

Valores representados em média ± erro padrão. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$). STD= grupo controle; HC = grupo hipercolesterolêmico; HC + 11S = grupo 11S grão de bico (300 mg/kg/dia); HC + SVT = grupo sinvastatina (50 mg/kg/dia).

Não houve diferença estatística quanto ao consumo alimentar entre os grupos estudados. Embora o grupo HC+SVT tenha apresentado menor ingestão, esta não influenciou no ganho de peso e peso final deste grupo. O grupo HC apresentou maior ganho de peso e conseqüentemente maior peso final em relação aos outros grupos o que demonstra a contribuição do ácido cólico, do colesterol e do óleo de coco acrescentados à dieta.

O peso seco das fezes foi 10,62% maior no grupo HC do que no grupo STD, resultado semelhante foi encontrado por Ferreira et al. (2011) que ao alimentarem um grupo de ratos com dieta acrescida de 1% de colesterol e 0,5% de ácido cólico constataram um aumento de 37,55% na excreção fecal. Entretanto, uma excreção mais pronunciada foi verificada no grupo HC+11S, sendo 28,14% maior que no grupo STD, 19,60% no HC e 21,60% no HC+SVT.

Os dados de excreção fecal embora relatados na literatura (RHO et al, 2007; FUKUI et al., 2002; ZULET; MARTÍNEZ, 1995) são ainda inconclusivos em função da metodologia de coleta, variabilidade por conseguinte do excreta fecal não sendo possível inferir que diferenças entre fontes lipídicas interferiram neste parâmetro.

4.6. Peso do fígado e índice hepatossomático

Na Tabela 4, o peso do fígado e o índice hepatossomático foram significativamente maiores nos grupos HC, HC +11S e HC + SVT assim como reportados por Fassini et al.(2011), Ferreira et al. (2011) e Bettzieche et al. (2007), o que sugere a ocorrência de uma mudança no tecido hepático, caracterizado por uma alteração na coloração do órgão e nas atividades enzimáticas quando este é exposto a uma dieta hipercolesterolêmica. A Figura 3 mostra a diferença no aspecto

e coloração nos órgãos hepáticos dos grupos experimentais em decorrência da hipercolesterolemia.

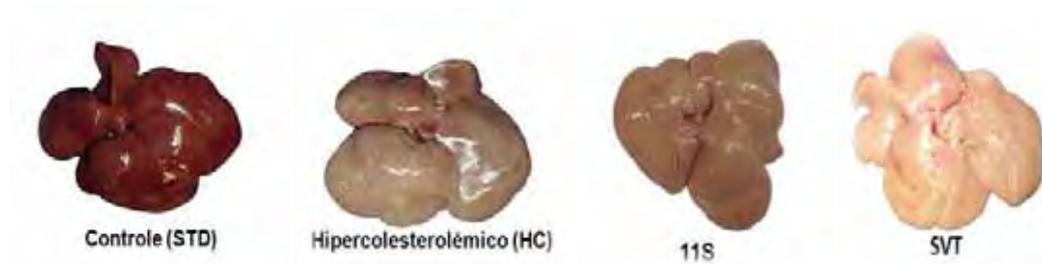


Figura 3: Fígado dos grupos experimentais após 28 dias de tratamento.

Tem-se conhecimento estabelecido na literatura sobre a influência de concentrações de fármacos como um parâmetro toxicológico no tecido hepático, porém no presente estudo pode-se observar que o mesmo não ocorre em relação à proteína do alimento, o que sugere um efeito positivo da proteína.

Díaz-Zagoya et al. (1999) em um estudo de toxicidade da sinvastatina, verificou que doses de até 62 mg/kg/peso corporal durante dez dias não provocou alterações no peso do fígado e nos níveis de lipídeos totais e triglicerídeos de ratos alimentados com dieta normolipídica. Contudo, a administração deste medicamento, nestas mesmas dosagens, associado a uma dieta hipercolesterolêmica ocasionou modificações bioquímicas e patológicas neste órgão.

Oms et al. (1995) analisou os efeitos de 10 mg/kg/peso corpóreo de sinvastatina em hamsters alimentados com dietas normolipídica e hipercolesterolêmica acrescida de 0,12% de colesterol e 20% de óleo de coco durante doze dias e observou que em associação com dieta hipercolesterolêmica, a sinvastatina provocou alterações bioquímicas e morfológicas, precedidas por anorexia e perda de peso.

A ocorrência de anorexia relatada por Oms et al. (1995) corrobora com Knopp (1999) que a caracteriza como um dos sintomas associados a hepatite decorrente do uso de estatinas. O presente estudo também observou que apesar de não ter influenciado diretamente no ganho de peso houve uma diminuição no consumo alimentar (Tabela 3) dos animais hipercolesterolêmicos tratados com sinvastatina, indicando que a menor ingestão alimentar pode estar associada a danos hepáticos.

Tabela 4: Peso do fígado e índice hepatossomático dos grupos experimentais

	Dieta Padrão		Dieta Hiperlipidêmica	
	STD	HC	11S	SVT
Peso do fígado (g/rato)	11,41 ± 0,32 ^b	19,72 ± 0,72 ^a	18,64 ± 0,91 ^a	18,49 ± 0,41 ^a
Índice hepatossomático	3,2 ± 0,08 ^b	5,51 ± 0,10 ^a	5,63 ± 0,11 ^a	5,43 ± 0,18 ^a

Valores representados em média ± erro padrão. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais. STD = grupo controle; HC = grupo hipercolesterolêmico; HC+11S = grupo 11S grão de bico; HC+SVT = grupo sinvastatina. Índice hepatossomático = [(peso do fígado/peso corpóreo) x 100].

4.7. Lipídeos e lipoproteínas plasmáticas

O perfil lipídico plasmático apresentado na Tabela 5 indica que os ratos do grupo HC apresentaram uma situação de hipercolesterolemia claramente elevada quando comparada ao grupo STD, acompanhada de um decréscimo no HDL-C e uma elevação das frações não-HDL-C. Zulet e Martínez (1995) também observaram esta situação quando alimentaram um grupo de ratos com dieta hipercolesterolêmica contendo 25% de gordura de óleo de coco, 1% de colesterol e 0,5% de ácido cólico. Essas alterações caracterizam o quadro de hiperlipidemia, que está associado a uma baixa regulação nos receptores de LDL-C pelo colesterol e ácidos graxos incluídos na dieta (CHEN et al, 2008; CHARLTON-MENYS, DURRINGTON, 2007 GENEST, 2003; KNOOP, 1999; ZULET et al., 1999).

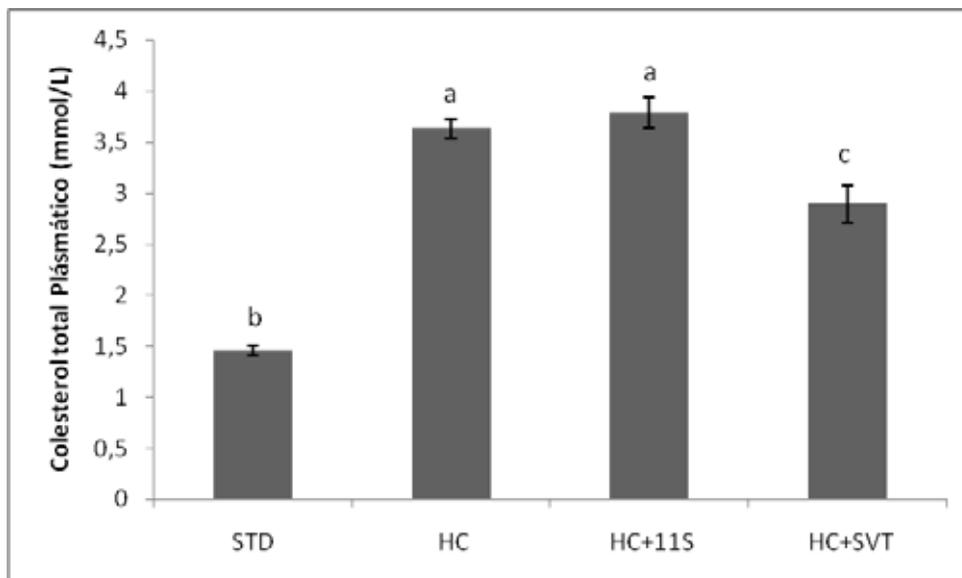


Figura 4: Concentração plasmática de colesterol total dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. Valores representados em média \pm erro padrão. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). STD = grupo controle; HC = grupo hipercolesterolêmico; HC+11S = grupo 11S grão de bico 300 mg/kg/dia; HC+SVT = grupo sinvastatina 50 mg/kg/dia

A Figura 4 ilustra os níveis plasmáticos de colesterol total. No grupo HC foi observado um aumento de 59,78% no colesterol total quando comparado ao STD,

isso decorreu, pelo menos parcialmente, do acréscimo de 0,5% de ácido cólico, 1% de colesterol e 20% de gordura de coco total hidrogenada à dieta. Feoli et al. (2003) e Gilani et al. (2002) verificaram em seus trabalhos que as gorduras saturadas e insaturadas acrescentadas às dietas experimentais alteraram as concentrações plasmáticas de colesterol, razão LDL-C/HDL-C e composição de lipoproteínas, sendo que a constituição de ácidos graxos da gordura saturada do óleo de coco tiveram uma maior influência sobre o metabolismo lipídico em relação ao óleo de soja.

A gordura saturada do óleo de coco possui principalmente ácidos láurico, mirístico e palmítico constituídos por cadeias de 12, 14 e 16 carbonos, respectivamente, que afetam a resposta pós prandial das lipoproteínas, uma vez que a absorção dos remanescentes de quilomícrons advindos da gordura saturada é mais lenta, além de interferir na expressão gênica das apolipoproteínas, ocasionando a elevação do colesterol total circulante (GILANI et al, 2002; ZULET et al, 1999).

Embora haja dados favoráveis da globulina 11S da soja em relação a redução do colesterol plasmático, o mesmo não ocorreu com a fração 11S do grão de bico. Este resultado corrobora com os encontrados por Boualga et al. (2009), Bettzieche et al. (2008) e Shukla et al. (2007). Bettzieche et al. (2008) verificaram que a dieta hipercolesterolêmica apresentou correlação positiva com os níveis de colesterol quando comparada ao grupo controle, porém a ingestão do concentrado proteico de tremoço não influenciou esta variável. Shukla et al. (2007) sugeriu que este fato pode ter ocorrido pela menor expressão do receptor de LDL devido a menor concentração de RNAm deste receptor.

Tabela 5: Avaliação dos efeitos dos diferentes tratamentos estudados a nível sérico, hepático e fecal.

	Dieta Padrão		Dieta Hipercolesterolêmica	
	STD	HC	11S	SVT
Plasma (mmol/L)				
Colesterol total	1,46 ± 0,05 ^b	3,63 ± 0,09 ^a	3,79 ± 0,15 ^a	2,89 ± 0,18 ^c
HDL	0,96 ± 0,04 ^a	0,70 ± 0,03 ^a	0,68 ± 0,11 ^a	0,83 ± 0,09 ^a
não-HDL	0,5 ± 0,06 ^b	2,93 ± 0,09 ^a	3,03 ± 0,18 ^a	2,03 ± 0,25 ^c
Triacilglicérides	0,48 ± 0,02 ^b	0,73 ± 0,01 ^a	0,52 ± 0,07 ^b	0,68 ± 0,06 ^a
Índice aterogénico	0,55 ± 0,08 ^b	4,23 ± 0,26 ^a	3,81 ± 0,31 ^a	2,89 ± 0,28 ^{ac}
Glicose	6,27 ± 0,15 ^{ac}	5,86 ± 0,15 ^{bc}	5,73 ± 0,09 ^{bc}	6,85 ± 0,26 ^a
Fígado (μmol/g)				
Colesterol total	4,39 ± 0,20 ^d	23,37 ± 0,91 ^a	11,34 ± 0,28 ^c	20,73 ± 0,38 ^b
Triglicérides	45,82 ± 2,76 ^c	76,65 ± 2,94 ^a	13,27 ± 0,79 ^b	72,10 ± 1,53 ^a
Fecal				
Lipídeos totais	60,97 ± 1,26 ^d	152,99 ± 1,97 ^c	221,13 ± 6,31 ^a	168,96 ± 1,51 ^b
Colesterol Total	1,77 ± 0,03 ^d	21,93 ± 0,09 ^b	12,64 ± 0,18 ^c	23,62 ± 0,12 ^a

Valores representados em média ± erro padrão. Diferentes letras sobscritas na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais. STD = grupo controle; HC = grupo hipercolesterolêmico; HC+11S = grupo 11S grão de bico; HC+SVT = grupo sinvastatina.

A redução de 20,38% nos níveis de colesterol total do grupo HC+SVT (Figura 4) e de 30,72% na fração não-HDL-C (Tabela 5) em comparação com o grupo HC está associada com o mecanismo de ação deste medicamento que regula a expressão de HMG-CoAr, diminuindo a formação de VLDL-C no fígado e concentração sérica de LDL-C (DREXEL, 2009; CHEN et al., 2008).

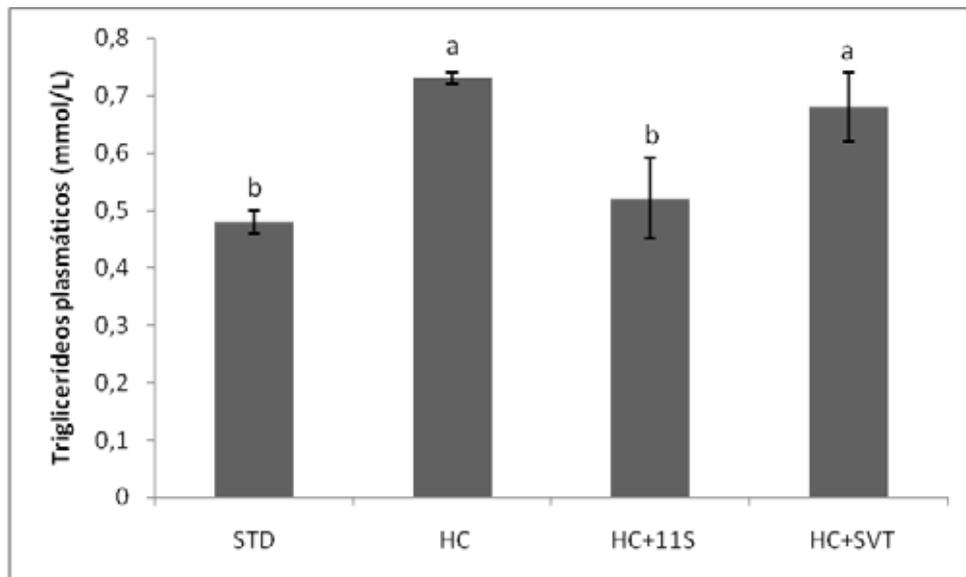


Figura 5: Concentração plasmática de triglicerídeos dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. Valores representados em média \pm erro padrão. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). STD = grupo controle; HC = grupo hipercolesterolêmico; HC+11S = grupo 11S grão de bico (300 mg/kg/dia); HC+SVT = grupo sinvastatina (50 mg/kg/dia).

A Figura 5 mostra o perfil plasmático dos triglicerídeos. O grupo HC apresentou um aumento de 34,25% em relação ao grupo STD, porém não apresentou diferença significativa do grupo HC+SVT, o que pode ser justificado pelo fato de que esta droga apesar de agir de maneira eficaz sobre o metabolismo do colesterol, não atua diretamente sobre os níveis de triglicerídeos. Alguns estudos indicam que algumas estatinas podem diminuir os níveis de triglicerídeos e aumentar

os níveis de HDL-C, porém estas alterações não são expressivas (DREXEL, 2009; STANCU, SIMAS, 2001; KNOPP, 1999).

O grupo HC+11S apresentou uma redução de 28,77% e 23,53% nos níveis de triglicerídeos quando comparado aos grupos HC e HC+SVT, respectivamente. Pode-se observar na Figura 5, que os níveis de triglicerídeos séricos dos animais tratados com a globulina 11S do grão de bico aproximaram-se bastante dos valores apresentados pelo grupo STD, sugerindo que a proteína possa estar envolvida em uma resposta positiva quanto ao metabolismo de triglicerídeos independente da alteração nos níveis de colesterol como é também relatado por Boualga et al. (2009) e Shukla et al. (2007).

Os dados da Figura 5 são correlatos aos encontrados por Boualga et al. (2009) em seu estudo com ratos hipercolesterolêmicos alimentados com dieta acrescida de 20% de isolado proteico de grão de bico, em que observaram uma diminuição de 46,46% nos níveis séricos de triglicerídeos plasmáticos e 63,33% nos triglicerídeos presentes na composição do VLDL-C plasmático. Neste mesmo trabalho, Boualga et al. (2009) avaliaram ainda o efeito do isolado proteico da lentilha, verificando uma diminuição mais acentuada do que a apresentada pelo grão de bico, sendo de 57, 57% nos triglicerídeos séricos e de 84,17% nos triglicerídeos constituintes da VLDL-C, o que poderia ser causado por uma redução no transporte e síntese de VLDL-C e seus remanescentes pelo fígado.

Bettzieche et al. (2008) ao ofertar 5% de concentrado proteico de tremoço à ratos alimentados com dieta hipercolesterolêmica observaram uma redução de 52% na concentração de triglicerídeos da fração lipoproteica VLDL-C + quilomícrons, porém esta redução não refletiu de maneira significativa nos níveis de triglicerídeos

plasmáticos. Estes autores sugeriram que a adição de 20% do concentrado proteico de tremoço poderia interferir na concentração plasmática de triglicerídeos.

Spielmann et al. (2007) ao acrescentar 20% de proteína de tremoço à dieta de um grupo de ratos por 22 dias, verificou uma redução de 75,32% dos triglicerídeos plasmáticos e sugeriu que por pertencerem à mesma família, tremoço e soja poderiam exercer influência semelhante sobre o metabolismo lipídico. Shukla et al. (2007) verificaram a diminuição de 48,94% no nível de triglicerídeos plasmáticos, além da diminuição dos triglicerídeos constituintes das lipoproteínas LDL-C, HDL-C e VLDL-C + quilomícrons em 31,25%, 33,33% e 38,92%, respectivamente, quando ratos recebiam isolado protéico de soja sem isoflavona como fonte proteica. Estes autores sugerem que a diminuição acentuada dos níveis de triglicerídeos plasmáticos e hepáticos se deve à menor regulação do SREBP-1c e menor expressão dos principais genes envolvidos na síntese de ácidos graxos como a glicose-6-fosfato desidrogenase e Δ -9 desaturase.

O SREBP-1c é um fator de transcrição responsável pela regulação de genes envolvidos com a biossíntese de ácidos graxos e triglicerídeos no fígado pela ativação da transcrição do código genético de enzimas de síntese de ácidos graxos. O SREBP-1c é expresso no fígado, tecido adiposo, glândula adrenal, cérebro e músculos, sendo regulado pelas concentrações de insulina (BETTZIECHE et al., 2008; SPIELMANN et al., 2007; FERRÉ, FOUFELLE, 2007).

Knebel et al. (2012) estudaram um grupo de camundongos que apresentavam uma maior expressão gênica do SREBP-1c hepático decorrente de uma modificação genética e mostraram a influência da expressão gênica na síntese *de novo* de lipídeos e seu acúmulo nos hepatócitos. Ao final do experimento, estes camundongos apresentaram peso final, gordura visceral e peso do fígado maiores

que os do grupo controle. O colesterol plasmático não foi alterado, contudo as atividades das enzimas ALT e AST dobraram e houve um maior acúmulo de lipídeos hepáticos, caracterizando um quadro de esteatose. Esses resultados evidenciaram que o aumento da expressão hepática do SREBP-1c aumentou a síntese de enzimas lipogênicas levando a uma produção maior de triglicerídeos e seu acúmulo nos hepatócitos.

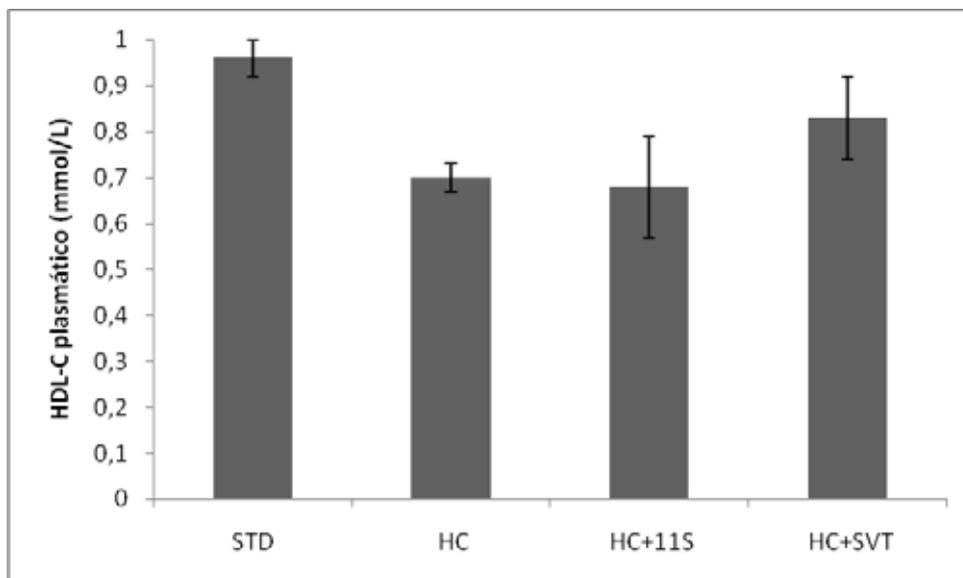


Figura 6: Concentração plasmática da lipoproteína HDL-C dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. Valores representados em média \pm erro padrão. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). STD = grupo controle; HC = grupo hipercolesterolêmico; HC+11S = grupo 11S grão de bico (300 mg/kg/dia); HC+SVT = grupo sinvastatina (50 mg/kg/dia).

A fração HDL-C plasmática tem sido considerada um fator de proteção contra o risco de doenças cardiovasculares uma vez que sua principal função no organismo é transportar éster de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado (CHARLTON-MENYS, DURRINGTON, 2007; GENEST, 2003; KNOOP, 1999). Fassini et al. (2011) em um estudo com ratos hipercolesterolêmicos tratados com 300 mg/kg/dia de

glicinina (11S) isolada de soja observou um aumento de 26,8% nos níveis de HDL-C plasmáticos.

No presente trabalho, não foi verificada diferença entre os grupos STD e aqueles alimentados com dieta hipercolesterolêmica quanto aos níveis de HDL-C, este fato também foi observado por Bettzieche et al. (2008) ao comparar grupos de animais normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos alimentados com caseína e proteína concentrada de tremço. Bettzieche et al. (2008) ainda verificaram que o tipo de proteína também não influenciou os níveis de HDL, confirmando os dados de Spielmann et al. (2007) que mesmo observando uma melhora no perfil lipídico em relação ao consumo de proteína concentrada de tremço, os níveis de HDL-C permaneceram inalterados.

Mesmo os resultados não apresentando diferença estatística entre si, o grupo HC+SVT apresentou um aumento de 15,66% nos níveis de HDL-C quando comparado ao grupo HC, corroborando com Knopp (1999) que ao caracterizar as estatinas verificou que uma dose diária de 40 mg de sinvastatina é capaz de promover um aumento de aproximadamente 12% no HDL-C plasmático.

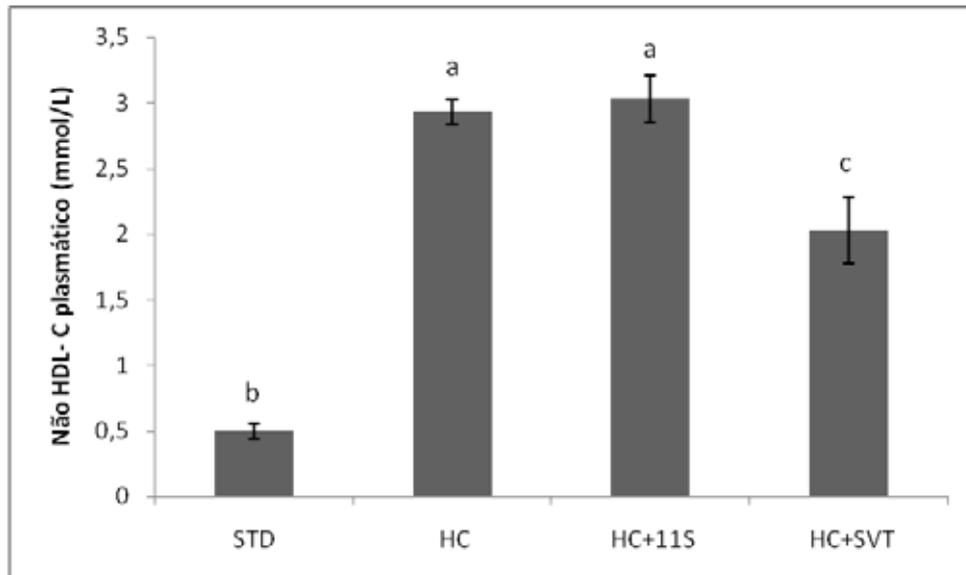


Figura 7: Concentração plasmática da fração não-HDL-C (VLDL-C + LDL-C) dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. Valores representados em média \pm erro padrão. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). STD = grupo controle; HC = grupo hipercolesterolêmico; HC+11S = grupo 11S grão de bico (300 mg/kg/dia); HC+SVT = grupo sinvastatina (50 mg/kg/dia).

Os valores da fração não-HDL-C encontrados nos grupos HC, HC+11S e HC+SVT são maiores 82,93%, 83,50% e 75,36%, respectivamente, que no grupo STD, concordando com os dados de Ferreira et al., (2011) e Fassini et al., (2011) que verificaram um aumento de aproximadamente 77% desta variável em relação ao grupo controle, indicando que a dieta oferecida influenciou neste nível sérico.

Não houve diferença significativa entre os grupos HC e HC+11S, o que mostra que a proteína não influenciou nesta fração. Ao contrário de vários estudos com a soja que verificaram a diminuição dos níveis de colesterol total e LDL-C plasmáticos, Shukla et al. (2007) não observaram uma diminuição significativa nessas concentrações, o que pode ter sido reflexo de uma redução na expressão do receptor de LDL-C.

Mesmo apresentando valor de não-HDL-C maior que o grupo STD, a administração de 50 mg/kg/dia de sinvastatina no grupo HC+ SVT, minimizou o

efeito da dieta em 30,72% em relação ao grupo HC, isso decorre da capacidade do medicamento em diminuir principalmente os níveis de LDL-C sérico.

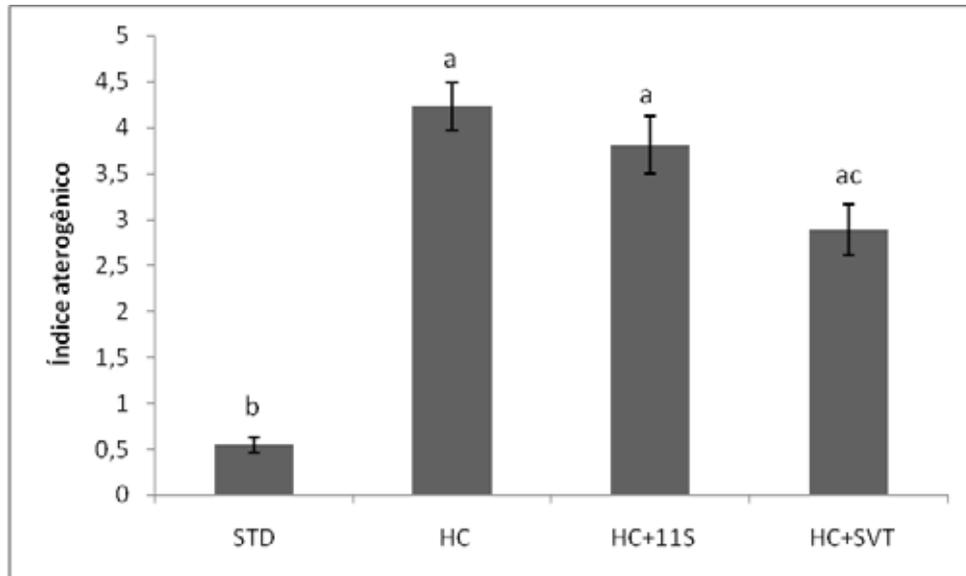


Figura 8: Índice aterogênico dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. Valores representados em média \pm erro padrão. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). STD = grupo controle; HC = grupo hipercolesterolêmico; HC+11S = grupo 11S grão de bico (300 mg/kg/dia); HC+SVT = grupo sinvastatina (50 mg/kg/dia). Índice aterogênico = colesterol total/HDL-C.

A Figura 8 mostra a influencia da dieta sobre o índice aterogênico uma vez que os grupos alimentados com dieta hipercolesterolêmica apresentaram índices maiores que o grupo STD, sendo 87% maior no grupo HC, 85,56% no grupo HC+11S e 80,96% no grupo HC+SVT. Os grupos HC e HC+11S não apresentaram diferença significativa entre si, já que a proteína 11S não apresentou efeito sobre estas variáveis como discutido anteriormente. A ação do medicamento foi novamente evidenciada pela redução de 31,68% no grupo HC+SVT em relação ao grupo HC.

O cálculo deste índice tem sido usado como indicador da predisposição à incidência de doenças cardiovasculares já que considera a razão entre as variáveis

não-HDL-C e HDL-C. Ferreira et al. (2012) observaram um aumento de 55,6% nos níveis de HDL-C e conseqüentemente uma diminuição de 56,5% no índice aterogênico deste grupo ao administrar 7S isolada de soja a ratos hipercolesterolêmicos. Resultado semelhante foi observado por Fassini et al. (2011) que verificaram o aumento de 26,8% nos níveis de HDL-C devido à ingestão da glicinina isolada da soja o que repercutiu de maneira benéfica sobre o índice aterogênico, verificando uma diminuição de 42,2% em relação ao grupo hipercolesterolêmico.

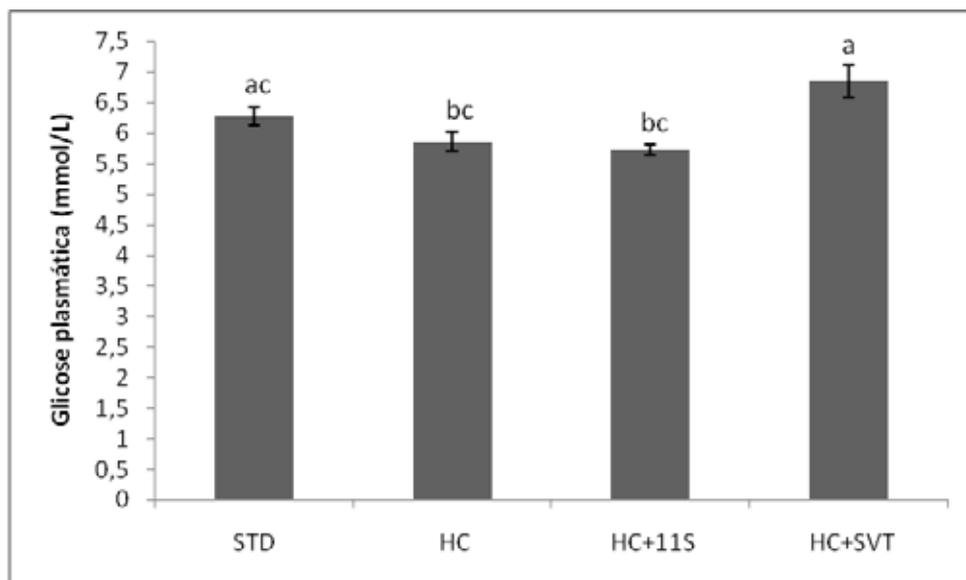


Figura 9: Concentração de glicose plasmática dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. Valores representados em média \pm erro padrão. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). STD = grupo controle; HC = grupo hipercolesterolêmico; HC+11S = grupo 11S grão de bico (300 mg/kg/dia); HC+SVT = grupo sinvastatina (50 mg/kg/dia).

O grupo HC+SVT apresentou os maiores valores referente à glicose plasmática, não apresentando diferença significativa quando comparado ao grupo STD, porém foi maior 14,45% que o grupo HC e 16,35% que o HC+11S. Estes, por

sua vez, não apresentaram diferença estatística entre si e nem em relação ao grupo STD, o que sugere que a dieta, a proteína e o medicamento não exerceram influência sobre os níveis de glicose plasmática.

Yang et al., (2007) ao introduzirem 10% de farinha de grão de bico à dieta de ratos hipercolesterolêmicos, não observaram diferença significativa entre os valores de glicose plasmática entre os grupos controle, HC e o que recebeu grão de bico assim como no presente estudo. Porém, sugeriram que mesmo não havendo diferença nos níveis de glicose entre os grupos, o grupo que recebia grão de bico apresentava uma melhor tolerância à glicose e resistência à insulina do que o grupo hipercolesterolêmico.

Estudos em humanos (PITTAWAY et al., 2008; NESTEL et al., 2004) e animais (YANG et al, 2007 e ZULLET et al., 1999) observaram uma melhora nos índices de insulina e glicose plasmáticas ao incorporarem grão de bico nas dietas, porém este efeito tem sido atribuído principalmente a presença de fibras, ao baixo índice glicêmico e ao predomínio das cadeias de amilose na constituição do amido que diminuem a hidrólise e absorção intestinal deste grão.

4.8. Lipídeos hepáticos

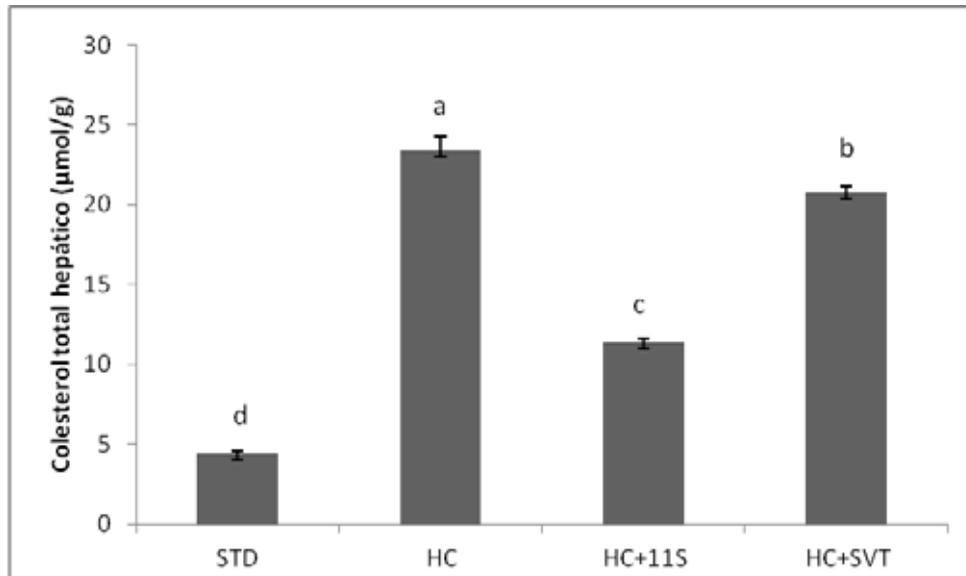


Figura 10: Concentração de colesterol total hepático dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. Valores representados em média \pm erro padrão. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). STD = grupo controle; HC = grupo hipercolesterolêmico; HC+11S = grupo 11S grão de bico (300 mg/kg/dia); HC+SVT = grupo sinvastatina (50 mg/kg/dia).

O grupo HC apresentou maior valor nos níveis de colesterol hepático, sendo 81,22% maior que o grupo STD como representado na Figura 10. A elevação nestes níveis também foi visualizada nos outros grupos alimentados com dieta hipercolesterolêmica. Contudo, a ingestão da proteína 11S reduziu em 51,48% os níveis de colesterol hepáticos do grupo HC+11S em relação ao grupo HC enquanto que o grupo que recebeu sinvastatina teve redução de 11,30% quando comparado a este mesmo grupo, mostrando que seu efeito mais representativo ocorre nos níveis plasmáticos.

Shukla et al. (2007) ao alimentarem ratos com dieta acrescida de 0,5% de colesterol e tendo o isolado protéico de soja sem isoflavona como fonte protéica observaram a redução dos níveis de colesterol e triglicérides hepáticos, o que

possivelmente decorre da menor concentração relativa de RNAm nos SREBP-1, SREBP-2 e genes envolvidos com a síntese e absorção de colesterol e triglicerídeos.

Boualga et al. (2009) verificou uma redução de 31,28% do colesterol hepático em ratos hipercolesterolêmicos que receberam proteína isolada de grão de bico, seguida por um aumento de 1,2 vezes na atividade da enzima lipase hepática. Os níveis de RNAm e atividade desta enzima são inversamente proporcionais ao conteúdo de colesterol hepático, o que influencia também nos níveis de triglicerídeos hepáticos já que sua atividade catalítica contribui para a hidrólise de fosfolípídeos, triglicerídeos constituintes de remanescentes de VLDL, LDL e HDL.

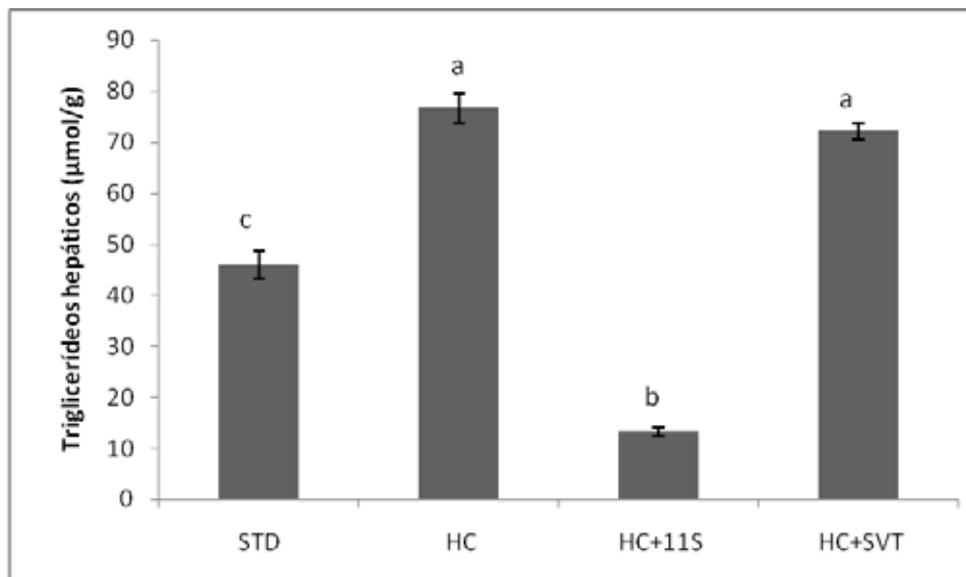


Figura 11: Concentração de triglicerídeos hepáticos dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. Valores representados em média \pm erro padrão. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). STD = grupo controle; HC = grupo hipercolesterolêmico; HC+11S = grupo 11S grão de bico (300 mg/kg/dia); HC+SVT = grupo sinvastatina (50 mg/kg/dia).

O grupo HC apresentou uma concentração de triglicerídeos hepáticos 40,24% maior do que o grupo STD, porém seus valores foram estatisticamente

iguais aos do grupo HC+SVT. No grupo HC+11S foi observado uma redução de 82,70% em relação ao grupo HC e de 81,60% quanto ao grupo HC+SVT.

Spielmann et al. (2007) observaram uma redução de 31,78% nos níveis de triglicerídeos hepáticos de ratos que receberam concentrado proteico de tremoço e sugeriram que esta redução é resultante, pelo menos parcialmente, da menor concentração da enzima ácido graxo sintase (FAS) no fígado, levando a uma menor expressão do SREBP-1c no tecido hepático destes animais e consequentemente a uma redução nas concentrações séricas e hepáticas dos triglicerídeos.

Bettzieche et al. (2008) observaram uma diminuição de 45,22% nos níveis de triglicerídeos hepáticos de ratos hipercolesterolêmicos alimentados com concentrado proteico de tremoço. Este fato pode ser decorrente da diminuição da expressão dos genes regulados por SREBP-1c como a glicose-6-fosfato desidrogenase, ácido graxo sintase, esteroil-CoA dessaturase-1 e acil-CoA: glicerol-3-fosfato aciltransferase, ocasionando uma diminuição da lipogênese via SREBP-1c. Outro mecanismo que pode estar envolvido no efeito hipotrigliceridêmico da proteína de tremoço é o aumento da hidrólise dos triglicerídeos devido a regulação da codificação do RNAm para lipase lipoproteica, lipase hepática e apolipoproteína A5. Embora o mecanismo utilizado pela proteína para aumentar os níveis do RNAm desses genes não sejam conhecidos, provavelmente o aumento da regulação da apo A5 foi causado pela menor regulação do SREBP-1c.

Boualga et al. (2009) verificaram uma diminuição de 31,18% nos valores dos triglicerídeos hepáticos de ratos hipercolesterolêmicos alimentados com isolado proteico de grão de bico, sugerindo que esta redução possa ser causada por uma alteração na transcrição do RNAm dos genes hepáticos envolvidos com a síntese de novo dos ácidos graxos e também com os genes associados com a hidrólise de

triglicerídeos assim como relatado por Bettzieche et al. (2008) e Spielmann et al. (2007).

4.9. Lipídeos fecais

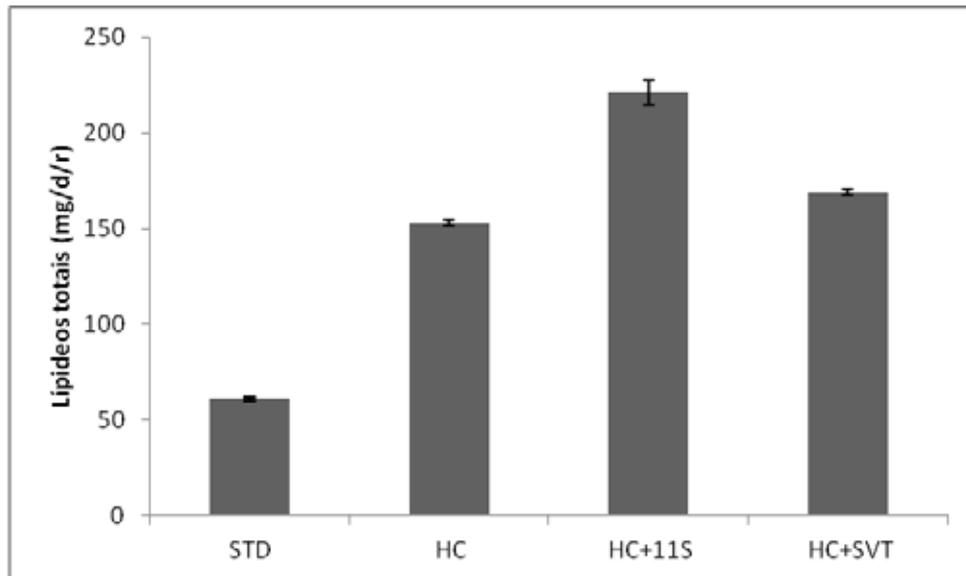


Figura 12: Lipídeos totais extraídos das fezes dos grupos com diferentes tratamentos nos 5 dias finais de experimento. Valores representados em média \pm erro padrão. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). STD = grupo controle; HC = grupo hipercolesterolêmico; HC+11S = grupo 11S grão de bico (300 mg/kg/dia); HC+SVT = grupo sinvastatina (50 mg/kg/dia).

Em geral, os grupos alimentados com dieta hipercolesterolêmica apresentaram maior excreção fecal de lipídeos totais que o STD. Contudo, os grupos que receberam a globulina 11S e o medicamento como tratamento tiveram maior excreção em relação ao grupo HC, 30,81% e 9,45% respectivamente. O grupo HC+11S ainda apresentou excreção 72,42% maior que o grupo STD e 23,59% que o HC+SVT.

Farvin, Surendraraj, Anandan (2009) verificaram que a administração de 20 mg de sinvastatina por 45 dias não promoveu alteração na excreção fecal de

lipídeos totais e colesterol quando comparado ao grupo controle que recebeu dieta com adição de 2% de óleo de coco, sugerindo que este não seja o mecanismo utilizado para eliminação destes.

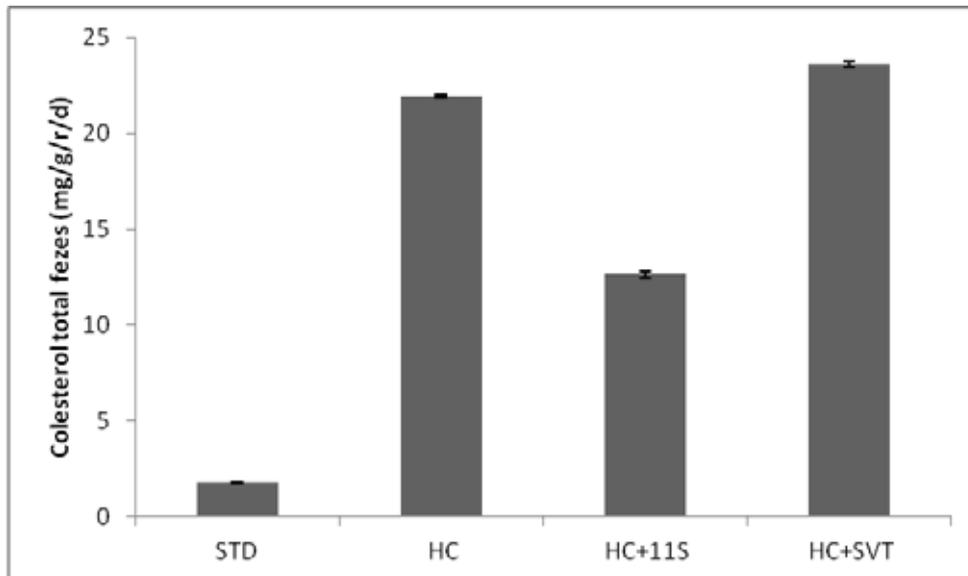


Figura 13: Colesterol total das fezes dos grupos com diferentes tratamentos nos 5 dias finais de experimento. Valores representados em média \pm erro padrão. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). STD = padrão; HC = hipercolesterolêmico; HC+11S = legumina 300 mg/kg/dia; HC+SVT = sinvastatina 50 mg/kg/dia.

Assim como nos lipídeos totais, os grupos hipercolesterolêmicos apresentaram maior excreção que o STD, sendo a excreção do HC maior em 91,93%, 86% no grupo HC+11S e 92,51% no HC+SVT. A sinvastatina apresentou maior excreção de colesterol total, sendo maior 7,15% em relação ao HC e 46,49% que o HC+11S. Contudo, Sudhop et al. (2009) observaram que a administração de 20 mg de sinvastatina em homens com hipercolesterolemia moderada não ocasionou uma maior excreção fecal de colesterol, apesar da diminuição de 26,4% do colesterol plasmático.

Rho et al. (2007) verificaram uma redução de 25,27% nos níveis séricos de colesterol total em ratos alimentados com 10% de hidrolisado de soja, seguida pelo aumento de 14% na excreção de colesterol total. Esse mecanismo reflete umas das possíveis ações da soja sobre o metabolismo lipídico, na qual se baseia na ativação dos receptores de LDL, diminuindo a concentração plasmática do colesterol e aumentando a excreção de ácidos biliares. Porém é ainda inconclusivo o mecanismo pelo qual se dá a eliminação de colesterol promovida pela 11S do grão de bico.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir da caracterização da globulina 11S do grão de bico demonstraram a eficiência do isolamento, produzindo um rendimento de 41,68% da fração legumina em relação à globulina total.

A dieta hipercolesterolêmica provocou um acúmulo de lipídeos nos fígados dos ratos alimentados por esta dieta, caracterizado pela coloração amarelada e um aumento do tamanho do órgão. Contudo, os danos hepáticos mais pronunciados ocorreram no grupo HC+SVT, o que sugere que apesar de reduzir o colesterol plasmático certamente há um depósito deste no fígado, causando modificações bioquímicas e morfológicas.

A fração 11S do grão de bico não alterou os níveis plasmáticos de colesterol total, porém esta apresentou uma maior ação sobre o colesterol total hepático que apresentou uma redução de 51,48% além de um efeito hipotrigliceridêmico no plasma e no tecido hepático de respectivamente, 28,77% e 82,70%, certamente devido a regulação dos níveis do fator de transcrição SREBP-1c envolvido na síntese de ácidos graxos e triglicerídeos. Este resultado demonstra que apesar da existência de uma homologia estrutural entre as globulinas 11S, estas agem de maneira diferente sobre o metabolismo lipídico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.R.; GOLDEN, D.L.; ANTHONY, M.S. 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.

ANDERSON, J.W.; JONHSTONE, B.M.; COOK-NEWELL, M.E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. **N. Engl. J. Med.**, v. 333, n. 5, p.276-282, 1995.

AOAC. ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 16th 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.

BETTZIECHE A.; BRANDSCH, C.; WEIßE K.; HIRCHE, F.; EDER, K.; STANGL, G.I. Lupin protein influences the expression of hepatic genes involved in fatty acid synthesis and triacylglycerol hydrolysis of adult rats. **Br. J. Nutr.**, v. 99, p. 952–962, 2008.

BOUALGA, A.; PROST, J.; TALEB-SENOUCI, D.; KROUF, D.; KHAROUBI, O.; LAMRI-SENHADJI, M.; BELLEVILLE, J.; BOUCHENAK, M. Purified chickpea or lentil proteins impair VLDL metabolism and lipoprotein lipase activity in epididymal fat, but not in muscle, compared to casein, in growing rats. **Eur. J. Nut.**, v.48, p.162-169, 2009.

CARR, T.P.; JESH, E.D. Food components that reduce cholesterol absorption. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.51, p.165-204, 2006.

CHANG, Y.; ALLI, I.; MOLINA, A.T.; KONISHI, Y; BOYE, J.I. Isolation and characterization of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed protein fractions. **Food Bioprocess Technol.**, 2009.

CHARLTON-MENYS, V.; DURRINGTON, P.N. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. **Exp. Physiol.** v.93, supl.1, p. 27–42, 2007.

CHAVAN, J.K.; KADAM, S.S.; SALUNKE, D.K. Biochemistry and technology of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** v.25, p.107-158, 1986.

CHEN, Z.; JIAO, R.; MA, K.Y. Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods. **J. Agric. Food Chem**, v.56, n.19, p. 8761–8773, 2008.

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.

COSTA-SCHARPLATZ, M.; RAMANATHAN, K.; FRIAL, T.; BEAMER, B.; GANDHI, S. Cost-effectiveness analysis of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin from a canadian health system perspective. **Clinical Therapeutics**, v. 30, n.7, 2008.

DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D.J.; BOULTER, D. Review: Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. **Phytochemistry**, v. 15, p.3-24, 1976.

DÍAZ-ZAGOYA, J.C.; ASENJO-BARRÓN, J.C.; CÁRDENAS-VÁZQUEZ, R.; MARTÍNEZ, F. JUÁREZ-OROPEZA, F.M. Comparative toxicity of high doses of vastatins currently used by clinicians, in CD-I male mice fed with a hypercholesterolemic diet. **Life Sciences**, v. 65, n.9, p. 947-956, 1999.

DREXEL, H. Statins, fibrates, nicotinic acid, cholesterol absorption inhibitors, anion-exchange resins, omega-3 fatty acids: which drugs for which patients? **Fundam. Clin. Pharmacol.** v.23, p. 687–692, 2009.

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

DURANTI, M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. **Fitoterapia**, v.77, n.2, p. 67-82, 2005.

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.

EMAMI, S.; TABIL, L.G. Processing of starch-rich and protein-rich fractions from chickpeas-a review. **ASAE/CSAE North-Central Intersectional Meeting**, 2002.

FARVIN, K.H.S.; SURENDRARAJ, A.; ANANDAN, R. Synergistic effect of squalene and simvastatin on fecal cholesterol excretion in rats. **Asian Journal of Clinical Nutrition**, v.1, n.2, p.102-106, 2009.

FASSINI, P.G.; FERREIRA, E.S.; SILVA, M.A.; NEVES, V.A.; DEMONTE, A. Soybean glycinin (11S) increases HDL-cholesterol in hypercholesterolemic rats. **Nutr. Food Sci.**, v.42, compl.2, 2012.

FASSINI, P.G.; NODA, R.W.; FERREIRA, E.S.; SILVA, M.A.; NEVES, V.A.; DEMONTE, A. Soybean glycinin improves HDL-C and suppresses the effects of rosuvastatin on hypercholesterolemic rats. **Lipids in Health and Disease**. v. 10, 2011.

FEOLI, A.M.; ROEHRIG, C.; ROTTA, L.N.; KRUGER, A.H.; SOUZA, K.B.; KESSLER, A.M.; RENZ, S.V.; BRUSQUE, A.N., SOUZA, D.O.; PERRY, M.L.S. Serum and liver lipids in rats and chicks fed with diets containing different oils. **Nutrition**, v.19, n.9; p.789–793, 2003.

FÉRRE, P.; FOUFELLE, F. SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. **Horm. Res.**, v.68, p.72–82, 2007.

FERREIRA, E.S.; SILVA, M.A.; DEMONTE, A.; NEVES, V.A. Soy β -conglycinin (7S globulin) reduces plasma and liver cholesterol in rats fed hypercholesterolemic diet. **J. Med. Food**. v. 14, p.94-100, 2011.

FERREIRA, E.S.; SILVA, M.A.; DEMONTE, A.; NEVES, V.A. β -conglycinin combined with fenofibrate or rosuvastatin have exerted distinct hypocholesterolemic effects in rats., v.11, n.11, 2012.

FOLCH J., LEES M., SLOANE-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J Biol Chem**, v.226, p. 497–509, 1957.
FRIEDMAN, M. Nutritional value of protein from different food sources. A review. **J. Agric. Food Chem.**, v.44, p.6-29, 1996.

FUKUI, K.; KOJIMA, M.; TACHIBANA, N. 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. et al. Isoflavone-free soy protein prepared by column chromatography reduces plasma cholesterol in rats. **J. Agric. Food Chem**. v.50, p. 5717-5721, 2002.

GENEST, J. Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. **J. Inherit. Metab. Dis**. v.26, p. 267-287, 2003.

GIL, J.; NADAL, S.; LUNA, D.; MORENO, M.T.; HARO, A. Variability of some physico-chemical characters in Desi and Kabuli chickpea types. **J Sci Food Agric**. v.71, p. 179-184, 1996.

GILANI, G.S.; RATNAYAKE, W.M.N.; BROOKS, S.P.J.; BOTTING, H.G.; PLOUFFE, L.J.; LAMPI, B.J. Effects of dietary protein and fat on cholesterol and fat metabolism in rats. **Nutrition Research**, v. 22, p. 297–311, 2002.

HAUG, A.; HOSTMARK, A. T. Lipoprotein lipases, lipoproteins and tissue lipids in rats fed fish oil or coconut oil. **The J. Nutr.**, v. 117, n. 6, p. 1011-1017, 1987.

IONESCU A.; APRODU I.; DARABĂ A.; GURĂU G.; BACIU C.; NICHITA A. Chemical and functional characterization of chickpea protein derivatives. **International Symposium Euro – Aliment**, 2009.

KAHLON, T.S.; SHAO, Q. In vitro binding of bile acids by soy bean (*Glycine max*), black eye bean (*Vigna unguiculata*), garbanzo (*Cicer arietinum*) and lima bean (*Phaseolus lunatus*). **Food Chemistry**, v.86, p. 435–440, 2004.

KAUR, M.; SINGH, N. Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. **Food Chemistry**, v.102, p.366-374, 2007.

KHALIL, A.W.; ZEB, A.; MAHMOOD, F.; TARIQ, S.; KHATTAK, A.B.; SHAH, H. Comparison of sprout quality characteristics of desi and kalubi type chickpea cultivars (*Cicer arietinum* L.). **Food Science and Technology**, v.40, p.937-945, 2007.

KNEBEL, B.; HAAS, J.; HARTWIG, S.; JACOB, S.; KÖLLMER, C.; NITZGEN, U.; MULLER–WIELAND, D.; KOTZKA, J. Liver-Specific Expression of transcriptionally active srebp-1c is associated with fatty liver and increased visceral fat mass. **Plos one**, n.2, v.7, 2012.

KNOPP, R.H. Drug treatment of lipid disorders. **The New England Journal of Medicine**. v.341, n.7, p.498-511, 1999.

KRIS-ETHERTON, P.M.; HARRIS, W.; APPEL, L.J. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. **Circulation**, v.106, p.2747-57, 2002.

KWON, D. Y.; OH, S. W.; LEE, J. S.; YANG, H. J.; LEE, S. H.; LEE, J. H.; LEE, Y. B.; SOHN, H. S. Amino acid substitution of hypocholesterolemic peptide originated from glycinin hydrolysate. **Food Sci. Biotechnol.**, v.11, n.1, p.55-61, 2002.

KUMAR, K.G.; VENKATARAMAN, L.V. Chickpea seed proteins: isolation and characterization of 10,3 S protein. **J. Agric. Food Chem.**, v.28, p.524-529, 1980.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LIU, R. H. Whole grain phytochemicals and health. **J. Cereal Sci.** v. 46, p.207 - 219, 2007.

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

LOVATI, M.R.; MANZONI, C.; CORSINI, A. Low density lipoprotein receptor activity is modulated by soybean globulins in cell culture. **J. Nutr.** 122; 197-1978, 1992.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, L.A.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265-275, 1951.
 MARCONE, M.F. Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: a current understanding with emphasis on 11S seed globulins. **Food Research International**. v. 32, p. 79-92, 1999.

MARCONE, M.F., KAKUDA, Y.; YADA, R. Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants I. Isolation/purification and characterization. **Food Chemistry**. v. 62, n. 1, p. 27-47, 1998.

MARCONE, M.F., KAKUDA, Y.; YADA. Salt-soluble seed globulins of dicotyledonous and monocotyledonous plants II. Structural characterization. **Food Chemistry**. v. 63, n. 2, p. 265-274, 1998.

MILGATE, J.; ROBERTS, D.C.K. The nutritional e biological significance of saponins. **Nutr. Research**,, v.15, n.8, p.1223-1249, 1995.

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

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

NATH, N.; WIENER, R.; HARPER, A. E. 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.

NESTEL, P.; CEHUN, M.; CHRONOPOULOS, A. Effects of long-term consumption and single meals of chickpeas on plasma glucose, insulin, and triacylglycerol concentrations. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.79, p.390–5, 2004.

NEVES, V.A.; SILVA, M.A.; LOURENÇO, E.J. Caracterização e hidrólise in vitro da globulina principal de grão de bico (*Cicer arietinum* L.), var. IAC- Marrocos. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 24, n.1, p.139- 145, 2004.

OMS P.; ASSIE N.; BRUNIQUEL F.; DEGRYSE A.D.; VAN HAVERBEKE, G.; DELHON, A. Biochemical changes and morphological alterations of liver and kidney in hamsters after administration of the HMG-coenzyme A reductase inhibitor, simvastatin: prevention and reversibility by mevalonate. **Pharmacol. Toxicol.**, v.77, n.6,p.391-6, 1995.

PAREDES-LÓPEZ, O.; ORDORICA-FALOMIR, C.; OLIVARES-VÁSQUEZ, M.R. Chickpea protein isolates: physicochemical, functional and nutritional characterization. **Journal of Food Science**. v.56, n.3, 1991.

PAK, V.V.; KOO, M.S.; KASYMOVA, 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.

PITTSWAY, J.K.; ROBERTSON, I.K.; BALL, M.J. Chickpeas may influence fatty acid and fiber intake in an *ad libitum* diet, leading to small improvements in serum lipid profile and glycemic control. **J. Am. Diet. Assoc**, v.108, n.6, p.1009-10013, 2008.

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.; AHN, C.; SHIN, J.; 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.

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.

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

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

SÁNCHEZ-VIOQUE, R.; CLEMENTE, A.; VIOQUE, J.; BAUTISTA, J.; MILLÁN, F. Polar lipids of defatted chickpea (*Cicer arietinum* L.) flour and protein isolates. **Food Chemistry**. v. 63, n. 3, p. 357-361, 1998.

SCARAFONI, A.; MAGNI, C.; DURANTI, M. 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.

SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 19, p.117–125, 2004.

SCHULZ, I. Tratamento das dislipidemias: como e quando indicar a combinação de medicamentos hipolipemiantes. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.50, n.2, p. 344-359, 2006.

SHEWRY, P.R.; NAPIER, J.A.; TATHAM, A.S. Seed storage protein: structures and biosynthesis. **The Plant Cell**, v.7, p. 945-956, 1995.

SHUKLA, A.; BRANDSCH, C.; BETTZIECHE, A.; HIRCHE, F.; STANGL, G.I.; EDER, K. Isoflavone-poor soy protein alters the lipid metabolism of rats by SREBP-mediated down-regulation of hepatic genes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.18, n.5, p.313–321, 2007.

SILVA, M.A., NEVES, V.A., LOURENÇO, E.J. Frações protéicas e globulina principal de grão de bico (*Cicer arietinum* L.), cv IAC-Marrocos. **Alim. Nutr**, v.12, p.131-149, 2001.

SINGH, K.B. Chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Field Crops Research**, v. 53, p. 161-170, 1997.

SINGH, K.B.; BEJIGA, G.; MALHOTRA, R.S. Associations of some characters with seed yield in chickpea collections. **Euphytica**. v.49, p.83-88, 1990.

SIRTORI, C.R.; GALLI, C.; ANDERSON, J.W.; ARNOLDI, A. Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Focus on dietary proteins. **Atherosclerosis**, v. 203, p.8-17, 2008.

SOTELO, A.; FLORES, F.; HERNÁNDEZ, M. Chemical composition and nutritional value of Mexican varieties of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Plant Foods Human Nutrition**. v.37, p.299-306, 1987.

SPIELMANN, J.; STANGL, I.; EDER, K. Dietary pea protein stimulates bile acid excretion and lowers hepatic cholesterol concentration in rats. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.**, v.92, p.683–693, 2007.

STANCU, C.; SIMA, A. Statins: mechanism of action and effects. **J.Cell.Mol.Med.** v. 5, n.4, p. 378-387, 2001.

SUDHOP, T.; REBER, M.; TRIBBLE, D.; SAPRE, A.; TAGGART, W.; GIBBONS, P.; MUSLINER, T.; VON BERGMANN, K.; LÜTJOHANN, D. Changes in cholesterol absorption and cholesterol synthesis caused by ezetimibe and/or simvastatin in men. **J. Lipid Res.**, v.50, p. 2117–2123, 2009.

TAVANO, O.L., SILVA jr., S.I.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. Nutritional Responses of Rats to Diets Based on Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Seed Meal or Its Protein Fractions. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 11006-11010, 2008.

TAVANO, O.L. **Avaliação nutricional de frações protéicas do grão de bico (*Cicer arietnum L.*) var. IAC –Marrocos- Estudo *in vivo* e *in vitro***. 2002. 94f. Dissertação de mestrado (Mestre em Alimentos e Nutrição). Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

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.

TORRES, N.; TORRE-VILLALVAZO, I.; TOVAR, A.R. Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p. 365–373, 2006.

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

VARADY, K.A.; JONES, P.J. Combination diet and exercise interventions for the treatment of dyslipidemia: an effective preliminary strategy to lower cholesterol levels? **J. Nutr.**, v.135, p.1829-35, 2005.

WANG, X.; GAO, W.; ZHANG, J.; ZHANG, H.; JIANGUI, L.; HE, X.; MA, H. Subunit, amino acid composition and in vitro digestibility of protein isolates from Chinese kabuli and desi chickpea (*Cicer arietinum L.*) cultivars. **Food Research International**. v. 43, p. 567–572, 2010.

WITHANA-GAMAGE, T.S., WANASUNDARA, J.P.D., PIETRASIK,Z.; SHAND, P.J. Physicochemical, thermal and functional characterization of protein isolates from Kabuli and Desi chickpea (*Cicer arietinum L.*): a comparative study with soy (*Glycine max*) and pea (*Pisum sativum L.*). **J. Sci. Food Agric**. v.91, p.1022-1031, 2011.

WRIGHT, S.M.; SALTER, A.M. Effects of Soy Protein on Plasma Cholesterol and Bile Acid Excretion in Hamsters. **Comp. Biochem. Physiol.** v.119B, n. 2, p. 247–254, 1998.

YANG, Y.; ZHOU, L.; GU, Y.; ZHANG, Y. TANG, J.; LI, F.; SHANG, W.; JIANG, B.; YUE, X.; CHEN, M. Dietary chickpeas reverse visceral adiposity, dyslipidaemia and insulin resistance in rats induced by a chronic high-fat diet. **British Journal of Nutrition**, v.98, p.720-726; 2007.

YOSHIKAWA, M.; FUJITAB, H.; MATOBAA, N.; TAKENAKAA, Y.; YAMAMOTOA, T.; YAMAUCHI, R.; TSURUKI, H.; TAKAHATAC, K. Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases. **BioFactors**, v.12, p. 143–146, 2000.

YU, O.; MCGONNIGLE, B. Metabolic engineering of isoflavone biosynthesis. **Advances in Agronomy**, v.86, p.147-190, 2005.

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.

ZULET, M.A.; MACARULLA, M.T.; PORTILLO, M.P.; NOEL-SUBREVILLE, C.; HIGUERET, P.; MÁRTINEZ, J.A. Lipid and glucose utilization in hypercholesterolemic rats fed a diet containing heated chickpea (*Cicer arietnum L.*): a potential functional food. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, v.69, n.6, p.403-11, 1999.

ZULET, M.A.; MARTÍNEZ, J.A. Corretive role of chickpea intake on a dietary-induced model of hypercholesterolemia. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.48, p.269-277, 1995.

EFEITO POTENCIAL DA FRAÇÃO PROTEICA 11S DO GRÃO DE BICO (*Cicer arietinum* L.) NA HIPERLIPIDEMIA: ESTUDO EM MODELO ANIMAL

RESUMO: Estudos da literatura indicam que globulinas 11S de leguminosas apresentam uma grande homologia sequencial e estrutural. A glicinina (11S) da soja possui atividade hipocolesterolêmica em experimentos *in vitro* and *in vivo* e algumas evidências mostram que a ingestão do grão de bico além de estar relacionada à melhoria do perfil lipídico também está associada ao controle glicêmico. Assim, este trabalho avaliou a ação da globulina 11S isolada do grão de bico em ratos submetidos à dieta hipercolesterolêmica a fim de verificar se as semelhanças estruturais e químicas das globulinas 11S também teriam efeito correlato quanto à ação no metabolismo lipídico. Os animais foram sacrificados após 28 dias de tratamento, sendo feita a coleta de sangue e tecido hepático para análise do perfil lipídico. A 11S do grão de bico não influenciou os níveis de colesterol total e HDL-C plasmático, porém teve efeito hipotrigliceridêmico no plasma e no fígado, demonstrando que apesar das 11S apresentarem semelhanças estruturais, estas agem de maneira diferente sobre o metabolismo lipídico.

PALAVRAS CHAVE: grão de bico, legumina, dieta hipercolesterolêmica, perfil lipídico.

INTRODUÇÃO

O grão de bico ocupa o terceiro lugar na produção mundial de leguminosas e o aumento da sua produção nos últimos anos está associado ao seu custo ser relativamente baixo, por apresentar teor proteico considerável, boa digestibilidade e pequenas quantidades de fatores antinutricionais, favorecendo o emprego de suas

propriedades funcionais na indústria de alimentos (ROY; BOYE; SIMPSON, 2010; CHANG et al., 2009; EMAMI, TABIL, 2002; WANG et al., 2010). Na sua composição, o conteúdo de carboidratos (50-70%) se apresenta principalmente na forma de amido constituído de cadeias lineares de amilose o que influencia as concentrações adequadas de glicose e insulina pós-prandial (NESTEL et al., 2004; ZULET et al., 1999). O predomínio de ácidos graxos insaturados, fibras solúveis e insolúveis constituintes deste grão também contribuem no controle glicêmico e melhoria do perfil lipídico (BOUALGA et al., 2009; PITTMWAY et al., 2008; NESTEL et al., 2004; ZULET et al., 1999).

A fração proteica majoritária dessa leguminosa é a globulina, seguida das frações de albumina, glutelina e prolamina (TAVANO et al., 2008; LIU, 2007; SILVA et al 2001). Dentre as globulinas, a legumina (11S) é a fração principal semelhante ao que ocorre nos grãos da soja. Marcone et al. (1998; 1999) têm destacado que as globulinas 11S de mono e dicotiledôneas possuem composição de subunidades, peso molecular e conformação interna semelhantes como resultado de um possível gene ancestral comum.

Dentre os estudos na área dos compostos funcionais presentes nas leguminosas destaca-se o possível papel das globulinas 11S no metabolismo lipídico particularmente em quadros de hipercolesterolemia/hiperlipidemia evidenciado por inúmeros estudos *in vivo* e *in vitro* (FASSINI et al. 2011; PAK et al., 2005; LOVATI, MANZONI, CORSINI, 1992) que demonstram a participação da proteína no abaixamento do colesterol plasmático e aumento da fração HDL-C. Por outro lado, é reconhecido o papel das estatinas como fármacos amplamente utilizados nos quadros hipercolesterolêmicos embora com reflexos no metabolismo hepático. Com isso, demonstrar os efeitos dessas proteínas no metabolismo lipídico abriria

perspectivas positivas na área de compostos funcionais, principalmente nos quadros de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia e suas consequências.

Em vista ao exposto, este trabalho avaliou o efeito da globulina 11S do grão de bico nas concentrações séricas e hepáticas de colesterol total e triglicerídeos e nas frações HDL-c e não-HDL-c em animais hipercolesterolêmicos a fim de verificar se as semelhanças estruturais e químicas das globulinas 11S também teriam efeito correlato quanto à ação no metabolismo lipídico. Para isso, o tratamento farmacológico com estatina foi utilizado, a semelhança da proteína, para comparação quanto à possível ação similar.

MÉTODOS

Isolamento da fração 11S do grão-de-bico

A fração 11S foi obtida a partir da farinha desengordurada do grão, conforme Kumar & Venkataraman (1980), acompanhada de determinação proteica pelo método de Lowry et al. (1951) nas etapas de obtenção. Após extração, o material foi submetido à coluna de cromatografia em gel Sepharose CL-6B e caracterização eletroforética por SDS-PAGE como descrito por Laemmli (1970).

Composição da dieta experimental

As dietas dos grupos experimentais foram elaboradas segundo a AIN-93G (REEVES et al., 1993). Para induzir a hipercolesterolemia foi acrescentado 1% de colesterol, 0,5% de ácido cólico e 20% de óleo de coco hidrogenado como fonte lipídica.

Ensaio Experimental

Ratos machos adultos (*Rattus norvegicus* var. *albinus*) da linhagem Wistar foram mantidos em gaiolas individuais em condições controladas de temperatura, umidade e ciclo claro-escuro de 12 horas. Os grupos (n=9) assim designados: Controle- STD (Proteína padrão Caseína), Hipercolesterolêmico- HC (com modificação da fonte lipídica da dieta padrão), Grupo Grão de Bico- HC+GB (dieta hipercolesterolêmica e 300 mg/Kg de peso/dia da fração protéica 11S isolada) e Grupo Sinvastatina- HC+SVT (dieta hipercolesterolêmica e 50 mg/kg de peso /dia da estatina comercial) foram tratados por 28 dias, recebendo os tratamentos com a proteína e o medicamento por gavagem e a pesagem corporal avaliada em intervalos de dois dias.

Ao final do experimento e após jejum de 12 horas, os animais foram sacrificados e a coleta de sangue realizada para as análises de colesterol total, HDL-C e triglicerídeos por kits enzimáticos comerciais (Labtest, BR). A fração não HDL-C (LDL-C + VLDL-C) foi calculada pela diferença entre o colesterol total e o HDL-C. Os fígados dos animais foram pesados, lavados em solução salina e congelados a -20°C para posteriores análises. A extração de lipídeos totais e colesterol hepático foram realizados conforme procedimento descrito por Folch et al. (1957) e Haug e Hostmark (1987), respectivamente, e em seguida procedeu-se a quantificação do colesterol total através de kits enzimáticos (Labtest, BR). O índice hepato-somático foi calculado pela relação (peso do fígado/peso corpóreo) x 100.

Análise estatística

Utilizou-se a análise da variância (ANOVA) e o teste de Student-Newman-Keuls (SNK), para comparação múltipla entre os tratamentos, estabelecendo $p < 0,05$ como nível de significância.

RESULTADOS

A Tabela 1 indica o ganho de peso e o consumo alimentar dos grupos estudados. Não houve diferença no consumo alimentar entre os grupos, com exceção do grupo HC+SVT que apresentou menor ingestão, porém esta não influenciou o ganho de peso e peso final deste grupo.

Tabela 1: Peso corporal, ganho de peso, consumo alimentar e excreção dos grupos experimentais.

	Dieta Padrão		Dieta Hipercolesterolêmica	
	STD	HC	HC+11S	HC+SVT
Peso inicial (g/rato)	184,30 ± 3,73	183,80 ± 3,87	177,99 ± 4,02	182,1 ± 3,62
Peso final (g/rato)	351,00 ± 3,48 ^{ab}	372,50 ± 6,32 ^a	330,13 ± 10,15 ^b	327,87 ± 6,9 ^b
Ganho de peso (g/rato/dia)	5,88 ± 0,08 ^b	6,79 ± 0,23 ^a	5,43 ± 0,28 ^b	5,26 ± 0,19 ^b
Consumo alimentar (g/rato/dia)	18,92 ± 0,31 ^a	18,19 ± 0,47 ^a	19,52 ± 0,46 ^a	15,66 ± 0,45 ^b
Excreção fecal (g/rato/dia)	1,43 ± 0,04 ^b	1,60 ± 0,04 ^c	1,99 ± 0,04 ^a	1,56 ± 0,05 ^{bc}

Valores representados em média ± erro padrão. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$). STD= grupo controle; HC = grupo hipercolesterolêmico; HC + 11S = grupo 11S grão de bico (300 mg/kg/dia); HC + SVT = grupo sinvastatina (50 mg/kg/dia).

O grupo HC apresentou os maiores valores de peso final e ganho de peso. O peso do fígado e o índice hepatossomático (Tabela 2) também foram significativamente maiores nos grupos HC, HC +11S e HC + SVT, decorrente da

contribuição do ácido cólico, do colesterol e do óleo de coco acrescentados à dieta hipercolesterolemica/hiperlipidêmica.

Tabela 2: Peso do fígado e índice hepatossomático dos grupos experimentais.

	Dieta Padrão		Dieta Hiperlipidêmica	
	STD	HC	HC+11S	HC+SVT
Peso do fígado (g/rato)	11,41 ± 0,32 ^b	19,72 ± 0,72 ^a	18,64 ± 0,91 ^a	18,49 ± 0,41 ^a
Índice hepatossomático	3,2 ± 0,08 ^b	5,51 ± 0,10 ^a	5,63 ± 0,11 ^a	5,43 ± 0,18 ^a

Valores representados em média ± erro padrão. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$). STD= grupo controle; HC = grupo hipercolesterolêmico; HC + 11S = grupo 11S grão de bico (300 mg/kg/dia); HC + SVT = grupo sinvastatina (50 mg/kg/dia). Índice hepatossomático = (peso do fígado/peso corpóreo) x 100.

O perfil lipídico plasmático apresentado na Tabela 3 indica que os ratos do grupo HC apresentaram uma situação de hipercolesterolemia claramente elevada quando comparada ao grupo STD, acompanhada de um decréscimo no HDL e uma elevação das frações não-HDL-C. Os resultados de colesterol e HDL-C plasmáticos observados no grupo HC+11S mostram que a fração 11S do grão de bico parece não ter influência sobre estes níveis. Por outro lado, os resultados dos níveis de triglicerídeos plasmáticos indicaram uma redução de 28,77% no grupo HC+11S em relação ao grupo HC e de apenas 7 % no grupo HC+SVT, sugerindo que a fração proteica pode estar envolvida na resposta positiva quanto aos triglicerídeos semelhante a que apresentou o grupo STD. Nos níveis hepáticos, a fração 11S do grão de bico também ocasionou uma redução de triglicerídeos em 82,70% e de colesterol em 51,8% em relação ao grupo HC enquanto apenas 6% e 11,3% de redução foram observados para o grupo HC+SVT em relação ao HC, respectivamente.

Tabela 3: Perfil lipídico plasmático e hepático referente aos diferentes tratamentos.

	Dieta Padrão		Dieta Hipercolesterolêmica	
	STD	HC	11S	SVT
<i>Plasma (mmol/L)</i>				
Colesterol total	1,46 ± 0,05 ^b	3,63 ± 0,09 ^a	3,79 ± 0,15 ^a	2,89 ± 0,18 ^c
HDL-C	0,96 ± 0,04 ^a	0,70 ± 0,03 ^a	0,68 ± 0,11 ^a	0,83 ± 0,09 ^a
não-HDL-C	0,5 ± 0,06 ^b	2,93 ± 0,09 ^a	3,03 ± 0,18 ^a	2,03 ± 0,25 ^c
Triacilglicerídeos	0,48 ± 0,02 ^b	0,73 ± 0,01 ^a	0,52 ± 0,07 ^b	0,68 ± 0,06 ^a
<i>Fígado (μmol/g)</i>				
Colesterol total	4,39 ± 0,20 ^d	23,37 ± 0,91 ^a	11,34 ± 0,28 ^c	20,73 ± 0,38 ^b
Triglicerídeos	45,82 ± 2,76 ^c	76,65 ± 2,94 ^a	13,27 ± 0,79 ^b	72,1 ± 1,53 ^a

Valores representados em média ± erro padrão. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$). STD= grupo controle; HC = grupo hipercolesterolêmico; HC + 11S = grupo 11S grão de bico (300 mg/kg/dia); HC + SVT = grupo sinvastatina (50 mg/kg/dia).

DISCUSSÃO

A administração da proteína 11S por gavagem resultou em uma pequena adição (2,05%) do consumo proteico da dieta não influenciando a relação de ingesta e ganho de peso, o que nos permitiu avaliar o seu papel como composto funcional.

O maior peso do fígado e índice hepatossomático nos grupos HC, HC +11S e HC+SVT, sugerem a alteração observada na coloração do tecido hepático e nas atividades enzimáticas do órgão quando exposto a uma dieta hipercolesterolêmica, conforme dados reportados por Fassini et al.(2011), Ferreira et al. (2011) e Bettzieche et al. (2008). A ingestão da proteína não causou nenhum prejuízo ao órgão, contudo os danos toxicológicos mais pronunciados ocorreram no grupo HC+SVT caracterizados pelo aspecto descolorido do fígado e esteatose (dados não

mostrados), o que sugere que apesar de reduzir o colesterol plasmático certamente há um depósito deste no fígado, causando modificações bioquímicas e morfológicas.

As alterações dos níveis plasmáticos nos grupos HC caracterizaram o quadro de hiperlipidemia, associado com uma baixa regulação nos receptores de LDL-C pelo colesterol e ácidos graxos incluídos na dieta (CHEN et al, 2008; CHARLTON-MENYS, DURRINGTON, 2007 GENEST, 2003; KNOOP, 1999; ZULET et al., 1999). Na dieta hiperlipídica, pode-se constatar que a composição do óleo de coco e seus ácidos graxos saturados principalmente mirístico, láurico e palmítico possivelmente afetam a resposta pós prandial das lipoproteínas e a expressão gênica das apolipoproteínas o que poderia explicar a elevação do colesterol total plasmático (GILANI et al, 2002; ZULET et al, 1999).

Embora a resposta hipocolesterolêmica sérica não tenha ocorrido, como era esperado, houve uma redução dos triglicerídeos plasmáticos no grupo HC+11S como é também relatado por Boualga et al. (2009) e Bettzieche et al. (2008). Boualga et al. (2009), em seu estudo com isolados proteicos de grão de bico e lentilha e Bettzieche et al. (2008) ao trabalhar com proteína concentrada de tremçoço sugeriram que o efeito proteico na redução sérica de triglicerídeos pode estar relacionado com uma alteração na transcrição gênica do RNAm no tecido hepático envolvida com a síntese de novo de ácidos graxos e com genes associados com a hidrólise de triglicerídeos. A hipotrigliceridemia a nível plasmático também poderia estar associada ao aumento da hidrólise dos triglicerídeos pela lipase lipoproteica ou pela diminuição de síntese da fração VLDL-C (BOUALGA et al., 2009).

A redução do colesterol hepático no grupo HC+11S também foi constatado por Shukla et al. (2007) quando compararam os efeitos da proteína 11S da soja no quadro hipercolesterolêmico. Outras evidências foram demonstradas por Boualga et

al. (2009) que verificaram uma maior atividade da lipase hepática nos grupos que receberam proteína de grão de bico e lentilha, o que pode justificar a redução dos níveis de colesterol no fígado. Este fato é sustentado pelos resultados obtidos por Bettzieche et al. (2008) e Spielmann et al. (2007) que mostraram que a proteína de tremoço reduziu a síntese de ácidos graxos pela inibição da expressão do SREBP-1c que regula a ativação da transcrição gênica de enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos.

A redução de 82,70% nos níveis hepáticos de triglicerídeos do grupo HC+11S em relação ao grupo HC também foi citada por Boualga et al. (2009), Bettzieche et al. (2008), Spielmann et al. (2007) e Shukla et al. (2007). Os mecanismos envolvidos nesta ação certamente estariam relacionados à diminuição da expressão dos genes regulados por SREBP-1c ou ainda pelo aumento da hidrólise dos triglicerídeos pela regulação da codificação do RNAm para lipase lipoproteica, lipase hepática e apolipoproteína A5.

CONCLUSÃO

A fração 11S do grão de bico não alterou os níveis plasmáticos de colesterol total e HDL-C, porém influenciou o colesterol hepático ao contrário do que foi visualizado no grupo HC+SVT que mesmo reduzindo consideravelmente os níveis de colesterol plasmático não o alterou a nível hepático.

A redução nas concentrações de triglicerídeos plasmáticos e hepáticos mostrou o efeito hipotrigliceridêmico da fração 11S do grão de bico, sugerindo que maiores evidências na inibição gênica e/ou regulação do SREBP-1c devem ser investigadas. Estes dados demonstram que apesar da existência de uma homologia

estrutural entre as globulinas 11S, estas agem de maneira diferente sobre o metabolismo lipídico.

ABSTRACT

Studies in the literature indicate that 11S globulins of legumes present a great sequence and structural homology. The glycinin (11S) of soybean has hypocholesterolemic activity in experiments *in vitro* and *in vivo* and some evidence shows that intake of chickpeas in addition to be related to improved lipid profile is also associated with glycemic control. Thus, this study evaluated the action of the 11S globulin isolated from chickpeas in rats subjected to a hypercholesterolemic diet in order to verify that the structural and chemical similarities of 11S globulins also have correlative effect on the action on lipid metabolism. The animals were sacrificed after 28 days of treatment, being made to collect blood and liver tissue for lipid profile analysis. The 11S of chickpeas did not influence the levels of plasma total cholesterol and HDL, but had hypotriglyceridemic effect in plasma and liver, demonstrating that despite the 11S present structural similarities, they act differently on lipid metabolism.

KEYWORDS: chickpeas, legumin, hypercholesterolemic diet, lipid profile.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BETTZIECHE A.; BRANDSCH, C.; WEIßE K.; HIRCHE, F.; EDER, K.; STANGL, G.I. Lupin protein influences the expression of hepatic genes involved in fatty acid synthesis and triacylglycerol hydrolysis of adult rats. **Br. J. Nutr.**, v. 99, p. 952–962, 2008.

BOUALGA, A.; PROST, J.; TALEB-SENOUCI, D.; KROUF, D.; KHAROUBI, O.; LAMRI-SENHADJI, M.; BELLEVILLE, J.; BOUCHENAK, M. Purified chickpea or lentil proteins impair VLDL metabolism and lipoprotein lipase activity in epididymal fat, but not in muscle, compared to casein, in growing rats. **Eur. J. Nut.**, v.48, p.162-169, 2009.

CHANG, Y.; ALLI, I.; MOLINA, A.T.; KONISHI, Y.; BOYE, J.I. Isolation and characterization of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed protein fractions. **Food Bioprocess Technol.**, 2009.

CHARLTON-MENYS, V.; DURRINGTON, P.N. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. **Exp. Physiol.** v.93, supl.1, p. 27–42, 2007.

CHEN, Z.; JIAO, R.; MA, K.Y. Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods. **J. Agric. Food Chem**, v.56, n.19, p. 8761–8773, 2008.

EMAMI, S.; TABIL, L.G. Processing of starch-rich and protein-rich fractions from chickpeas-a review. **ASAE/CSAE North-Central Intersectional Meeting**, 2002.

FASSINI, P.G.; NODA, R.W.; FERREIRA, E.S.; SILVA, M.A.; NEVES, V.A.; DEMONTE, A. Soybean glycinin improves HDL-C and suppresses the effects of rosuvastatin on hypercholesterolemic rats. **Lipids in Health and Disease**. v. 10, 2011.

FERREIRA, E.S.; SILVA, M.A.; DEMONTE, A.; NEVES, V.A. Soy β -conglycinin (7S globulin) reduces plasma and liver cholesterol in rats fed hypercholesterolemic diet. **J. Med. Food**. v. 14, p.94-100, 2011.

FOLCH J., LEES M., SLOANE-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J Biol Chem**, v.226, p. 497–509, 1957.

GENEST, J. Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. **J. Inherit. Metab. Dis.** v.26, p. 267-287, 2003.

GILANI, G.S.; RATNAYAKE, W.M.N.; BROOKS, S.P.J.; BOTTING, H.G.; PLOUFFE, L.J.; LAMPI, B.J. Effects of dietary protein and fat on cholesterol and fat metabolism in rats. **Nutrition Research**, v. 22, p. 297–311, 2002.

HAUG, A.; HOSTMARK, A. T. Lipoprotein lipases, lipoproteins and tissue lipids in rats fed fish oil or coconut oil. **The J. Nutr.**, v. 117, n. 6, p. 1011-1017, 1987.

KNOPP, R.H. Drug treatment of lipid disorders. **The New England Journal of Medicine**. v.341, n.7, p.498-511, 1999.

KUMAR, K.G.; VENKATARAMAN, L.V. Chickpea seed proteins: isolation and characterization of 10,3 S protein. **J. Agric. Food Chem.**, v.28, p.524-529, 1980.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LIU, R. H. Whole grain phytochemicals and health. **J. Cereal Sci.** v. 46, p.207 - 219, 2007.

LOVATI, M.R.; MANZONI, C.; CORSINI, A. Low density lipoprotein receptor activity is modulated by soybean globulins in cell culture. **J. Nutr.** 122; 197-1978, 1992.

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

MARCONE, M.F. Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: a current understanding with emphasis on 11S seed globulins. **Food Research International**. v. 32, p. 79-92, 1999.

MARCONE, M.F., KAKUDA, Y.; YADA, R. Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants I. Isolation/purification and characterization. **Food Chemistry**. v. 62, n. 1, p. 27-47, 1998.

NESTEL, P.; CEHUN, M.; CHRONOPOULOS, A. Effects of long-term consumption and single meals of chickpeas on plasma glucose, insulin, and triacylglycerol concentrations. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.79, p.390–5, 2004.

PAK, V.V.; KOO, M.S.; KASYMOVA, 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.

PITTSWAY, J.K.; ROBERTSON, I.K.; BALL, M.J. Chickpeas may influence fatty acid and fiber intake in an *ad libitum* diet, leading to small improvements in serum lipid profile and glycemic control. **J. Am. Diet. Assoc**, v.108, n.6, p.1009-10013, 2008.

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.

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

SHUKLA, A.; BRANDSCH, C.; BETTZIECHE, A.; HIRCHE, F.; STANGL, G.I.; EDER, K. Isoflavone-poor soy protein alters the lipid metabolism of rats by SREBP-mediated down-regulation of hepatic genes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.18, n.5, p.313–321, 2007.

SILVA, M.A., NEVES, V.A., LOURENÇO, E.J. Frações protéicas e globulina principal de grão de bico (*Cicer arietinum* L.), cv IAC-Marrocos. **Alim. Nutr**, v.12, p.131-149, 2001.

SPIELMANN, J.; STANGL, I.; EDER, K. Dietary pea protein stimulates bile acid excretion and lowers hepatic cholesterol concentration in rats. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.**, v.92, p.683–693, 2007.

TAVANO, O.L., SILVA jr., S.I.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. Nutritional Responses of Rats to Diets Based on Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Seed Meal or Its Protein Fractions. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 11006-11010, 2008.

WANG, X.; GAO, W.; ZHANG, J.; ZHANG, H.; JIANGUI, L.; HE, X.; MA, H. Subunit, amino acid composition and in vitro digestibility of protein isolates from Chinese kabuli and desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Research International*. v. 43, p. 567–572, 2010.

ZULET, M.A.; MACARULLA, M.T.; PORTILLO, M.P.; NOEL-SUBREVILLE, C.; HIGUERET, P.; MÁRTINEZ, J.A. Lipid and glucose utilization in hypercholesterolemic rats fed a diet containing heated chickpea (*Cicer arietinum* L.): a potential functional food. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, v.69, n.6, p.403-11, 1999.

