

ELIZABETHE ADRIANA ESTEVES

**VARIEDADES DE SOJA E SEUS EFEITOS NA REGULAÇÃO
DO METABOLISMO DO COLESTEROL EM RATOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2000

**Ao Reynaldo,
pela sua participação constante;
pelo amor, pelo carinho e pela confiança que nos une;
pelas alegrias e pelos sacrifícios compartilhados e
pelo estímulo e apoio em todos os momentos.**

**À minha saudosa mãe e ao meu pai,
a quem devo tudo que venho conquistando na vida.**

AGRADECIMENTO

A Deus, por ter me abençoado até aqui.

Ao Reynaldo e às nossas famílias, pelo incentivo em todos os momentos.

À Universidade Federal de Viçosa, em particular ao seu Departamento de Tecnologia de Alimentos, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade de realização do Curso e pelo apoio financeiro.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), especificamente ao seu Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior – PDEE, pela concessão da bolsa de estudos, o que possibilitou a realização do Doutorado-Sanduiche.

À professora Josefina Bressan Resende Monteiro, pela orientação e pela confiança em mim depositada durante estes anos de trabalho conjunto.

À professora Neuza Maria Brunoro Costa, minha gratidão especial pela preciosa colaboração, pelos ensinamentos e pelas críticas e sugestões.

Aos professores Maurílio Alves Moreira e José Carlos Gomes, pela participação e pelas sugestões, e ao professor José Benício Paes Chaves, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo - SP, em especial ao Dr. Lewis Joel Greene, pelas análises de aminoácidos.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição e Saúde, Adão e Ricardo, e do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Geralda, Maria Rita, Sr. Zé e Sr. Valente, pelo auxílio prestado.

Aos colegas de Curso, pela agradável convivência.

Às “gurias”, Marília e Maria Lúcia, por terem me recebido em West Lafayette, pela preciosa ajuda, pela agradável convivência e pela amizade construída em pouco tempo.

À amiga Suzana, por ter compartilhado alegrias, tristezas e saudades, tornando minha estada em Indiana mais agradável.

À minha grande amiga Hércia, pela pessoa grandiosa que é, pela ajuda nos momentos difíceis, pela alegria nos momentos felizes e por estarmos compartilhando há um bom tempo momentos importantes e decisivos de nossas vidas.

Aos meus sobrinhos e sobrinhas, irmãos e irmãs, em especial ao Beto, por continuar sendo um exemplo de força, e à Gogóia e Didi, pelo incentivo desde o “início”.

Ao “professor” Nélío, pelo estímulo, muitas vezes sem perceber.

À “madrinha”, pela torcida e pelo carinho.

Aos meus amigos, em especial aos de Bias Fortes, pela amizade, apesar do tempo e da distância, aos quais desejo alegrias e sucesso na vida.

I am very thankful to Dr. Jon A. Story, for his support during my time in Indiana and for his valuable contributions to this work; to Dr. Shawn S. Donkin, for his teaching and attendance.

I am also thankful to my colleagues, Katherine, Juan Carlos and Cansu, and to Carol Sphar, for their patience and help, and to Dr. Tanya Lodics, for her collaboration and readiness.

My special thanks to Purdue University, particularly its Department of Foods and Nutrition, for making possible the accomplishment of the Sandwich Program.

BIOGRAFIA

ELIZABETHE ADRIANA ESTEVES, filha de Joaquim Esteves Filho e Maria Aparecida Esteves de Oliveira, nasceu em 8 de setembro de 1969, em Bias Fortes, Minas Gerais.

Em março de 1989, iniciou o Curso de Graduação em Nutrição na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, concluindo-o em janeiro de 1994.

Em agosto de 1996, obteve o título de *Magister Scientiae* em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela Universidade Federal de Viçosa.

Em outubro de 1996, iniciou o Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em nível de doutorado, nessa mesma Instituição.

No período de março de 1999 a março de 2000, realizou treinamento, como Doutorado-Sanduíche, no Departamento de Alimentos e Nutrição da Universidade de Purdue, West Lafayette - IN, E.U.A.

Em outubro de 2000, submeteu-se à defesa de tese.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Aspectos gerais da soja.....	4
2.2. Composição da soja.....	5
2.2.1. Proteínas e aminoácidos.....	6
2.2.2. Lipídios e ácidos graxos.....	7
2.2.3. Carboidratos e fibras.....	8
2.2.4. Vitaminas, minerais e cinza.....	9
2.2.5. Fatores antinutricionais e enzimas.....	10
2.3. Regulação do metabolismo do colesterol.....	15
2.3.1. Regulação da biossíntese de colesterol.....	15
2.3.2. Regulação da biossíntese de ácidos biliares.....	18
2.4. Efeito hipocolesterolemizante da soja.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Caracterização dos cultivares de soja.....	26
3.1.1. Linhagem UFV116.....	26
3.1.2. Variedade OCEPAR-19.....	26

	Página
3.2. Produção das farinhas.....	27
3.3. Composição química.....	27
3.3.1. Proteínas.....	27
3.3.2. Perfil de aminoácidos.....	28
3.3.3. Lipídios totais.....	28
3.3.4. Perfil de ácidos graxos.....	29
3.3.5. Isoflavonas.....	29
3.4. Ensaio biológico.....	30
3.4.1. Animais e dietas.....	30
3.5. Análises de colesterol.....	32
3.6. Isolamento e quantificação de mRNA para 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase e colesterol 7 α -hidroxilase.....	32
3.7. Análises de esteróides fecais.....	33
3.8. Análises estatísticas.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. Composição química.....	35
4.1.1. Proteínas e aminoácidos.....	35
4.1.2. Lipídios totais e ácidos graxos.....	39
4.1.3. Isoflavonas.....	41
4.2. Ensaio biológico.....	43
4.2.1. Composição das dietas experimentais.....	43
4.2.2. Ingestão alimentar, ganho de peso e coeficiente de eficiência alimentar.....	44
4.3. Colesterol sérico e hepático e peso dos fígados.....	46
4.4. Abundância em mRNA para 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGR) e colesterol 7 α -hidroxilase (CYP7A).....	52
4.5. Excreção fecal de ácidos biliares e esteróides neutros.....	58
4.5.1. Ácidos biliares.....	58
4.5.2. Esteróides neutros totais.....	65
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

RESUMO

ESTEVEES, Elizabethe Adriana, D.S., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2000. **Variedades de soja e seus efeitos na regulação do metabolismo do colesterol em ratos.** Orientadora: Josefina Bressan Resende Monteiro. Conselheiros: Neuza Maria Brunoro Costa e Maurílio Alves Moreira.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de um novo cultivar de soja (UFV116), geneticamente melhorado para ausência das lipoxigenases 2 e 3, na regulação do metabolismo do colesterol. Utilizou-se uma variedade comercial (OCEPAR-19), para fins comparativos. Foram determinados os teores de proteínas e lipídios totais e a composição em aminoácidos, ácidos graxos e isoflavonas em farinhas obtidas dos grãos de ambos os cultivares. Não houve diferença significativa entre eles, com relação ao teor de proteína. O cultivar UFV116 apresentou maior teor de fenilalanina, treonina, tirosina, glicina, ácidos aspártico e glutâmico. O teor de lipídios totais foi menor para UFV116, que no entanto apresentou maiores teores de ácidos palmítico e linoléico e menores para esteárico, linolênico e oléico. Este cultivar apresentou maior teor de isoflavonas nas formas agliconas. Numa segunda etapa, grupos de ratos machos *Wistar* foram alimentados com dietas semipurificadas, nas quais as fontes protéicas foram provenientes dos cultivares UFV116 (UFV) e OCEPAR-19 (OCP) e da caseína (CAS), com ou sem a adição de colesterol dietético (0,25%), por 28 dias. O cultivar UFV116 foi mais eficaz na redução do

colesterol sérico na dieta sem adição de colesterol que a variedade OCEPAR-19. Contudo, não teve influência no acúmulo de colesterol no fígado, com e sem a adição de colesterol dietético. Ambos os cultivares reduziram o colesterol do sangue e seu acúmulo no fígado, em comparação à caseína, independente da adição de colesterol na dieta. Houve redução dos níveis de mRNA para 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGR) nas dietas de soja, quando comparadas com a caseína, independente da adição de colesterol dietético. As dietas de soja promoveram aumento nos níveis de mRNA para colesterol 7 α -hidroxilase (CYP7A), com e sem a adição de colesterol dietético, em comparação à caseína. Isto foi acompanhado por maior excreção de ácidos biliares fecais, especificamente ácidos biliares secundários. Não houve diferença significativa entre os cultivares de soja nos parâmetros avaliados. A adição de colesterol às dietas experimentais provocou aumento da excreção de esteróides neutros. Estes resultados evidenciam que o colesterol hepático provavelmente foi convertido em esteróides e excretado nas fezes, primariamente como ácidos biliares. Adicionalmente, a síntese hepática de colesterol foi reduzida, contribuindo para a manutenção dos baixos níveis séricos. É importante ressaltar que os componentes não-protéicos dos cultivares podem ter influenciado os seus efeitos hipocolesterolemiantes.

ABSTRACT

ESTEVEES, Elizabethe Adriana, D.S. Federal University of Viçosa, October, 2000. **Soybean varieties and their effects on cholesterol metabolism control in rats.** Adviser: Josefina Bressan Resende Monteiro. Committee members: Neuza Maria Brunoro Costa and Maurílio Alves Moreira.

The aim of this work was to determine the effects of a new Brazilian soybean variety (UFV116), lacking lipoxygenases 2 and 3, on cholesterol metabolism in rats. It was used a Brazilian commercial variety (OCEPAR-19) and casein to compare the results. The seeds of the two varieties were processed as soy flour. Analysis of protein, total lipids, aminoacids, fatty acids, and isoflavones were carried out on the soy flours. There was no statistical difference between the two varieties on protein content. The UFV116 variety showed higher amounts of phenylalanin, threonin, tyrosin, aspartic and glutamic acids and glycin. The OCEPAR-19 variety showed higher amounts of total lipids. The content of palmitic and linoleic acids was higher for UFV116, and OCEPAR-19 showed higher content for estearic, linolenic, and oleic acids. The UFV116 variety showed higher content of isoflavone aglicones. In a second step, the effect on cholesterol metabolism was determined in groups of male Wistar rats, fed semipurified diets (AIN93M) with protein from UFV116 (UFV) and OCEPAR-19 (OCP) and casein (CAS), with or without dietary cholesterol addition (0.25%) for 28 days. Total blood cholesterol-lowering effect was better

for UFV when no cholesterol was added to the diet, compared to OCP. However, it did not affect liver cholesterol, despite dietary cholesterol added. Both varieties lowered total cholesterol levels and liver accumulation on a similar way, compared to casein, regardless the cholesterol addition. There were lower levels of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) mRNA on groups fed soybean compared to CAS with or without cholesterol in the diet. Differently, soybean diets promoted higher levels of cholesterol 7- α -hydroxylase (CYP7A) mRNA, with or without dietary cholesterol, compared to casein. This was followed by a higher excretion of fecal bile acids, mainly secondary bile acids. No difference was observed between the two varieties in all parameters analyzed. There was higher fecal neutral steroid output when cholesterol was added to all diets. These results suggest that liver cholesterol was likely converted in steroids, increasing their fecal output, primarily, as bile acids. Additionally, liver cholesterol synthesis was reduced, so blood levels remained low. The non-protein compounds of the two soybeans studied may have influenced on their cholesterol-lowering effects.

1. INTRODUÇÃO

Os produtos de soja (*Glycine max*) têm sido, ao longo dos anos, importantes fontes de proteína e energia na dieta da população de muitos países orientais, acostumados ao seu sabor característico. No Brasil, a soja foi inicialmente desenvolvida visando a extração de óleos. No entanto, há muito tempo ela também vem sendo utilizada como fonte de proteína para alimentação animal e como ingrediente protéico para a elaboração dos mais variados tipos de alimentos.

Contudo, existe uma grande limitação em relação ao uso direto de produtos derivados de soja na alimentação humana, no Brasil e em outros países ocidentais. Esta limitação deve-se, principalmente, ao fato de tais produtos apresentarem sabores indesejáveis com relação aos padrões de palatabilidade dessa população, o que compromete suas propriedades sensoriais e diminui sua aceitabilidade (MORAIS e SILVA, 1996).

A ação catalítica das isozimas lipoxigenases sobre ácidos graxos poliinsaturados promove a formação de compostos carbonílicos de cadeia curta, que se associam às proteínas, resultando nos sabores indesejáveis mencionados. Vários são os tratamentos propostos para reduzir estes efeitos. Entretanto, além de não resolverem satisfatoriamente o problema, eles são caros, o que torna o produto final inviável (LIU, 1997).

A obtenção de cultivares de soja com ausência de lipoxigenases é uma alternativa para minimizar os problemas de sabor e odor dos produtos de soja e

para estimular seu consumo direto. Além do mais, a pesquisa científica vem demonstrando, ao longo dos anos, que a soja apresenta efeitos benéficos na prevenção e no tratamento de algumas doenças crônicas, como as doenças cardiovasculares, o câncer, o diabetes, entre outras (MORAIS e SILVA, 1996).

Uma das principais causas de morte em muitos países desenvolvidos têm sido doenças do coração e dos vasos sanguíneos, coletivamente conhecidas como doenças cardiovasculares (DCV) (WHITNEY e ROLFES, 1999). Os principais estudos relacionando dieta e DCV enfocam o conteúdo de gordura e colesterol da dieta. Vários destes estudos indicam que a ingestão de proteína de soja em substituição à proteína animal está associada com a redução do risco de desenvolver doenças cardiovasculares, o que é refletido pela diminuição dos níveis séricos de colesterol, principalmente LDL-colesterol (NAGATA et al., 1980; ANDERSON et al., 1995; CARROLL e KUROWSKA, 1995; POTTER, 1995, 1998; LICHTENSTEIN, 1998; TEIXEIRA et al., 2000).

Entretanto, os mecanismos pelos quais a proteína de soja altera as concentrações de colesterol e lipídios séricos ainda não estão elucidados. Estudos que investigam as alterações metabólicas induzidas pela proteína de soja têm apontado três teorias, aparentemente espécie-dependentes: aumento da excreção de ácidos biliares (aumento da síntese e atividade de colesterol 7- α -hidroxilase), efeito direto no metabolismo hepático do colesterol (aumento da síntese e atividade de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase) e efeitos endócrinos (alteração da concentração de hormônios, como a tiroxina) (POTTER, 1995). Entretanto, enquanto alguns desses mecanismos vêm sendo demonstrados em animais, em humanos eles ainda não são consistentes. Tal fato poderia ocorrer em virtude de inúmeros fatores. As variações entre os produtos de soja, causadas pelo processamento e pelo melhoramento genético, poderiam ser, em parte, responsáveis, já que existe um grande número de componentes biologicamente ativos presente em diferentes produtos de soja, como isoflavonas, saponinas, ácido fítico, inibidores de proteases, entre outros, os quais também podem estar envolvidos nos mecanismos hipocolesterolemiantes da proteína de soja.

O Programa de Melhoramento Genético da Universidade Federal de Viçosa, por meio de seu Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, vem, ao longo dos anos, desenvolvendo novas variedades de soja, visando a melhoria de uma série de características nos cultivares, dentre elas a qualidade sensorial. Novas variedades de soja, de sabores mais atenuados, viriam favorecer sua maior utilização na alimentação humana, como uma fonte energética e protéica de baixo custo e de boa qualidade.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de um novo cultivar de soja (UFV116) desenvolvido pelo BIOAGRO, geneticamente modificado para ausência das lipoxigenases 2 e 3, na regulação do metabolismo do colesterol em ratos, mais especificamente no controle de sua biossíntese endógena, no controle da biossíntese de ácidos biliares e na excreção de esteróides fecais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais da soja

A soja pertence à família das leguminosas e ao gênero *Glycine*, que compreende cerca de 15 espécies, dentre as quais se destaca a espécie *Glycine max*. É uma leguminosa herbácea, anual, ereta, de crescimento morfológico diversificado, semelhante ao feijão-comum. Seus grãos variam em forma, tamanho e cor, de acordo com a variedade: podem ser arredondados e até achatados, sendo geralmente ovais, e apresentam cores amarela, verde, preta ou combinações destas (SEDIYAMA et al., 1985).

O grão de soja chegou ao Brasil em 1908, com os primeiros imigrantes japoneses, mas foi introduzido oficialmente no Rio Grande do Sul em 1914. Porém, sua expansão aconteceu nos anos 70, com o interesse crescente da indústria de óleo e a demanda do mercado internacional. O cultivo em escala comercial ganhou impulso em virtude dos incentivos concedidos pelo governo e também do crescimento da demanda internacional, principalmente na Europa (BONATO e BONATO, 1987).

Até 1975, toda a produção brasileira de soja era realizada com cultivares e técnicas importadas dos Estados Unidos, onde as condições climáticas e os solos são diferentes do Brasil. Assim, a soja só produzia bem, em escala comercial nos Estados do Sul, onde os cultivares americanos encontravam condições semelhantes às dos Estados Unidos. A criação do

cultivar Tropical levou a soja para as Regiões Centro-Oeste, Nordeste e Norte do Brasil. A partir daí, inúmeros outros cultivares nacionais foram criados, para dar estabilidade ao cultivo de soja nas chamadas regiões de fronteira agrícola. Hoje, o Centro-Oeste é responsável por quase 50% da produção nacional de soja, que registra produtividade que já ultrapassa os 3500 kg ha⁻¹ ano⁻¹. A soja é também cultivada nas regiões Sul e Sudeste do Brasil e representa uma importante fonte na economia agrícola do país (EMBRAPA, 1994).

A produção mundial de soja, cujo volume participa do mercado internacional na formação da oferta e demanda do produto, está restrita principalmente a três países: Estados Unidos, Brasil e Argentina. Em nível mundial, o Brasil é o segundo maior produtor, devendo-se ressaltar que a safra de 1998/99 representou 19,7% (31 milhões de toneladas) da produção mundial, tendo sido inferior somente à dos Estados Unidos (47,7%, 75,03 milhões de toneladas) (NEGÓCIOS AGRÍCOLAS LTDA., 2000).

Contudo, a ótima produtividade e o valor nutricional da soja não têm influenciado sua inclusão direta na dieta alimentar do brasileiro. Sua utilização interna ocorre principalmente na forma de óleo (mais de 90% do consumo nacional), de farelo (para ração animal) e como ingrediente em produtos alimentícios (EMBRAPA, 1994).

2.2. Composição da soja

A soja é economicamente valorizada por causa da sua composição química característica. Os principais constituintes da soja são proteínas, lipídios, carboidratos, minerais e vitaminas. Em média, óleo e proteína juntos correspondem a aproximadamente 60% do grão seco. O conteúdo remanescente é composto principalmente de carboidratos e cinzas. A soja contém, em base seca, aproximadamente 40% de proteínas, 35% de carboidratos totais, 20% de óleos, 5% de cinzas e teor de umidade entre 12 e 14%. Os teores de constituintes da soja apresentam variações que podem ser influenciadas por fatores genéticos e pelo meio ambiente (WOLF e COWAN, 1975; SNYDER e KWON, 1987). Essa leguminosa apresenta, ainda, certos compostos em menor quantidade, como inibidores de tripsina, fitatos e oligossacarídeos, que são conhecidos como biologicamente ativos. Outros,

como as isoflavonas, têm sido reconhecidos por sua habilidade de prevenir certas doenças (LIU, 1997).

2.2.1. Proteínas e aminoácidos

A soja é a maior fonte de proteína vegetal para nutrição humana e animal em muitos países, fornecendo calorias, aminoácidos essenciais e nitrogênio. As proteínas da soja possuem grande importância comercial, devendo-se ressaltar que seus teores variam entre 37 e 44% em base seca. Em virtude deste elevado teor de proteína, a soja é bastante utilizada em formulações de produtos para alimentação humana e para ração animal.

Com base nas funções biológicas, as proteínas da soja são de dois tipos: proteínas de reserva e metabólicas. As proteínas metabólicas incluem as enzimas e as proteínas estruturais e estão envolvidas nas atividades celulares normais, incluindo a síntese das proteínas de reserva. As proteínas de reserva fornecem nitrogênio e carbono para o desenvolvimento da semente, durante a sua fase de germinação. Estas proteínas apresentam-se em maior proporção na soja (LIU, 1997).

Em relação aos padrões de solubilidades, as proteínas da soja são albuminas (solúveis em água) e globulinas (solúveis em solução salina), sendo a maior proporção de globulinas. Os dois tipos mais comuns na soja são a glicinina e a β -conglucina (LIU, 1997).

Contudo, a maneira mais precisa de identificar as proteínas da soja tem sido pelo coeficiente de sedimentação, utilizando a centrifugação para a separação das proteínas. Sob condições-tampão apropriadas, as proteínas da soja apresentam quatro frações após a ultracentrifugação, que são designadas 2, 7, 11 e 15S (S = unidade de Svedberg). Em geral, a análise das quatro frações tem mostrado que as porções 11S e 15S são proteínas puras. Mais especificamente, a fração 11S é a glicinina e corresponde a, pelo menos, um terço da proteína extraída, enquanto a fração 15S é um polímero de glicinina e corresponde a cerca de 10% da proteína extraída. Em contraste, a fração 2S corresponde a 20% e inclui os inibidores de tripsina e o citocromo C. A fração 7S corresponde a um terço e consiste de conglucina, α -amilase, lipoxigenase e hemaglutinina (NIELSEN, 1985).

A proteína de soja possui alto valor nutricional, apresentando elevado teor de lisina. Esta característica é muito importante em virtude da possibilidade de seu uso como suplemento em dietas à base de cereais, que são pobres em lisina. Apresenta como limitação apenas a deficiência em aminoácidos sulfurados, em que a metionina é o mais limitante, seguida pela cisteína e treonina (LIU, 1997).

2.2.2. Lipídios e ácidos graxos

Aproximadamente 20% do grão de soja integral é constituído de óleo, o qual possui pigmentos, fosfolipídios e ácidos graxos livres em sua composição (GARCÍA et al., 1997). Os lipídios do grão de soja estão contidos em organelas denominadas corpos lipídicos, situadas no retículo endoplasmático. Sua extração com hexano apresenta uma fração maior de triglicerídios e uma composição menor de fosfolipídios, ácidos graxos livres e ácidos graxos saponificáveis (SNYDER e KWON, 1987). A soja imatura verde contém teores de 15,58 a 21,80% de lipídios em base seca (SHANMUGASUNDARAM et al., 1990).

Cada gordura ou óleo natural, independente da sua origem, apresenta uma composição em ácidos graxos única. O óleo de soja é uma boa fonte de ácidos graxos essenciais ao organismo humano. Os ácidos graxos do óleo de soja são, na sua maioria, insaturados, cujo maior percentual corresponde ao ácido linoléico, seguido pelo oléico, palmítico, linolênico e esteárico, em ordem decrescente. O óleo de soja contém ainda alguns ácidos graxos em mínimas quantidades, como o araquidônico, o palmitoléico e o mirístico (LIU, 1997).

Os ácidos graxos linoléico (ômega-6) e linolênico (ômega-3) são considerados essenciais, porque os mamíferos, incluindo o homem, não podem sintetizá-los. Os demais ácidos poliinsaturados somente podem ser sintetizados a partir destes. Desta maneira, devem ser fornecidos pela dieta em quantidades adequadas. Os ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 são essenciais para um crescimento e desenvolvimento normais e podem desempenhar um papel importante na prevenção e no tratamento de doenças do coração, hipertensão, artrite e câncer (LIU, 1997).

O ácido linoléico é membro primário da família dos ácidos ômega-6. A partir dele, o corpo humano pode sintetizar outros ácidos ômega-6, como o ácido araquidônico. Já o ácido linolênico é o precursor dos ácidos graxos da família dos ômega-3, como os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosaheptaenóico (DHA). As células do corpo humano não possuem enzimas capazes de produzir os ácidos ômega-3 ou 6, nem tão pouco conseguem converter um ômega-3 em um ômega-6, ou vice-versa. Então, a melhor maneira de manter os suprimentos corporais destes ácidos poliinsaturados é obtê-los da dieta. Uma dieta balanceada, rica em grãos, leguminosas, vegetais folhosos e peixes, fornece os requerimentos para os ômega-3 e ômega-6 (WHITNEY e HOLFES, 1999).

Existe uma grande variação na composição em ácidos graxos do óleo de soja, resultante principalmente do melhoramento genético. A faixa de composição entre diversas variedades é de, aproximadamente, 8 a 17% para palmítico; de 3 a 30% para esteárico; de 25 a 60% para oléico e linoléico; e de 2 a 15% para linolênico (LIU, 1997).

2.2.3. Carboidratos e fibras

A porção de carboidratos do grão de soja corresponde, em média, a 35% em base seca, constituindo o segundo maior componente da soja. Entretanto, comercialmente, são menos importantes que os lipídios e as proteínas. O principal uso dos carboidratos da soja tem sido na alimentação animal, contribuindo para o enriquecimento calórico da dieta. Contudo, pesquisas recentes têm mostrado os benefícios dos oligossacarídeos dietéticos, assim como a relação benéfica entre o consumo de fibra dietética e o risco reduzido de câncer de cólon e outras doenças, o que vem aumentando o valor dos carboidratos da soja (LIU, 1997).

O principal carboidrato solúvel da soja imatura verde é a glicose. Com o amadurecimento do grão, este açúcar desaparece, predominando os açúcares não-redutores, como sacarose, rafinose e estaquiose. Os oligossacarídeos rafinose e estaquiose não são metabolizados pelo trato digestivo de humanos e são considerados, também, como fatores limitantes quanto ao uso da soja na alimentação humana, uma vez que favorecem a

ocorrência de flatulência, levando, em maior ou menor grau, a um certo desconforto e mal-estar (LIENER, 1994). Os carboidratos insolúveis da soja são a celulose, hemicelulose, pectina e aproximadamente 1% de amido, os quais estão localizados nas paredes celulares e materiais intersticiais. A maioria dos polissacarídios complexos e oligossacarídios do grão de soja é constituída de fibras alimentares, pois as paredes celulares contêm cerca de 30% de pectinas, 50% de hemicelulose e 20% de celulose. A casca da semente corresponde a aproximadamente 8% do peso seco do grão integral e contém cerca de 86% dos carboidratos complexos, contribuindo, assim, com a maior proporção de carboidratos insolúveis do grão de soja (LIU, 1997).

2.2.4. Vitaminas, minerais e cinza

A soja contém vitaminas hidro e lipossolúveis. As vitaminas hidrossolúveis presentes na soja incluem principalmente a tiamina, a riboflavina, a niacina, o ácido pantotênico e o ácido fólico. Não existe perda substancial dessas vitaminas durante a extração do óleo, e seu conteúdo varia de 626 a 685 µg/100 g e de 92 a 119 µg/100 g para para tiamina e riboflavina, respectivamente. O teor de ácido ascórbico é negligível na soja madura, apesar de estar presente em quantidades mensuráveis nas sementes imaturas e germinadas (FERNANDO e MURPHY, 1993).

O teor de cinza é um indicativo da quantidade total de compostos inorgânicos presentes na soja. A diferença no teor de cinzas de um cultivar para o outro pode ser influenciada principalmente pela composição do solo. O grão de soja seco contém, aproximadamente, 5% de cinza (SNYDER e KWON, 1987).

Entre os principais minerais presentes na soja, o potássio é encontrado em maior concentração, seguido pelo fósforo, magnésio, cálcio e sódio. O conteúdo destes minerais varia de 0,2 a 2,1%, em valores médios. Os minerais presentes em menores quantidades são o ferro, o zinco, o manganês, o cobre o selênio, entre outros, cujos conteúdos variam entre 0,01 e 140 ppm. O conteúdo mineral da soja, assim como de outros componentes, é influenciado pela variedade, pelo tipo de solo e pelo clima (PERKINS, 1995).

2.2.5. Fatores antinutricionais e enzimas

Do ponto de vista nutricional, a soja apresenta constituintes que são denominados antinutricionais ou indesejáveis, como ácido fítico, hemaglutininas, inibidores de tripsina, enzimas como peroxidases, lipoxigenases e beta-glucosidades, isoflavonóides e saponinas.

O ácido fítico ou inositol 1,2,3,4,5,6-hexafosfato é encontrado em vegetais, principalmente em grãos de cereais e leguminosas (GRAF, 1983). Sua distribuição nos cotilédones é uniforme e possivelmente ele está presente como fitato de potássio solúvel (CHERYAN, 1980). A soja apresenta cerca de 1,0 a 1,47% de fitatos em base seca, o que representa de 51,4 a 57,1% do total de fósforo das sementes (LIU, 1997). Os fitatos são quelantes e podem reduzir a disponibilidade de alguns minerais como nutrientes, como zinco, cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganês e molibdênio (SNYDER e KWON, 1987). A biodisponibilidade de minerais com relação ao efeito dos fitatos é influenciada pela presença de outros minerais na dieta, pela associação com proteínas, pelo tratamento térmico, pela forma de processamento do alimento, pelo pH do meio e por outros fatores (CHERYAN, 1980).

O fitato também interage fortemente com resíduos básicos de proteínas, podendo ser demonstrado, *in vitro*, que ele possui ação inibidora sobre várias enzimas importantes no sistema digestivo, como pepsina, tripsina e alfa-amilase (LIENER, 1994). Por apresentar essas propriedades, o fitato foi considerado como fator antinutricional por muito tempo. Atualmente, questiona-se seu papel como antinutricional, pois tem-se verificado sua ação antioxidante, de onde se conclui que ele pode ser utilizado em alimentos. Apresenta também capacidade de reduzir os níveis sanguíneos de colesterol e triglicerídios e de diminuir o risco do aparecimento de câncer de cólon (ZHOU e ERDMAN, 1995).

As hemaglutininas, fitohemaglutininas ou lectinas são largamente encontradas em vegetais e têm função desconhecida. São proteínas com capacidade de se ligar a açúcares ou glicoproteínas. Podem representar de 2 a 10% do conteúdo protéico das leguminosas, devendo-se ressaltar que a soja possui de 5 a 7%. Induzem alterações no pâncreas a curto, médio e longo

prazo, sendo responsáveis, *in vitro*, pela aglutinação de células vermelhas do sangue (GRANT, 1989).

Os inibidores de tripsina, desde 1971, têm sido relatados como inibidores do crescimento de animais jovens, quando alimentados com soja crua. Há descrições de pelo menos dois tipos de inibidores de tripsina na soja: Kunitz e Bowman-Birk (LIENER, 1994).

Os inibidores de tripsina denominados Kunitz e Bowman-Birk apresentam peso molecular de 21 e 8 KD, respectivamente. O Kunitz é específico para inibição da tripsina e contém dois sítios de reatividade. O Bowman-Birk inibe a tripsina e a quimiotripsina e sua atividade é relativamente resistente ao tratamento com ácido e pepsina (MCNIVEN, 1992). A adição de purificado de inibidor de tripsina Kunitz na dieta de ratos prejudica seu crescimento e a do inibidor de Bowman-Birk induz à hipersecreção de enzimas pancreáticas, levando à hipertrofia e hiperplasia do pâncreas em algumas espécies de animais (GRANT, 1989; MCNIVEN et al., 1992). O tratamento térmico reduz a atividade desses dois inibidores. Entretanto, para maximizar a destruição dos inibidores de tripsina e minimizar as perdas de outros componentes, tais como proteínas, é essencial a utilização de condições ótimas de temperatura, tempo, umidade e pressão. O tratamento com sulfito de sódio e o melhoramento genético são outras alternativas para inativação dos inibidores de tripsina (LIU, 1997).

As saponinas compreendem um grande grupo de compostos estruturalmente relacionados que contêm uma aglicona esteroidal ou triterpenoidal ligada a uma ou mais moléculas de oligossacarídeos e apresentam propriedades similares aos detergentes. O conteúdo de saponinas dos produtos de soja é de aproximadamente 0,1 a 0,5% em base seca. Quando administradas oralmente, as saponinas são pouco absorvidas, metabolizadas no intestino e excretadas intactas. Elas agem como surfactantes naturais e interagem prontamente com as membranas celulares, apresentando propriedades hemolíticas, sendo, por isto, consideradas “antinutricionais” e tóxicas. Entretanto, existe renovado interesse nas saponinas, pois recentes evidências mostram que elas também possuem algumas propriedades terapêuticas. Tem sido demonstrado que as saponinas possuem propriedades

hipocolesterolemiantes, imunoestimulatórias, antioxidantes, anticancerígenas, dentre outras (RAO e KORATKAR, 1997).

As isoflavonas (ou isoflavonóides) são compostos químicos fenólicos, pertencentes à classe dos fitoestrógenos, e se encontram amplamente distribuídos no reino vegetal. As concentrações desses compostos são relativamente maiores nas leguminosas, em particular na soja. As principais isoflavonas encontradas na soja e nos produtos de soja são a daidzeína, a genisteína e a gliciteína, termos que se referem à porção aglicona das isoflavonas. Na forma β -glucosídeo, elas se tornam genistina, daidzina e glicitina. Na forma acetilglucosídeo, são conhecidas como 6-O-acetilgenistina, 6-O-acetildaidzina e 6-O-acetilglicitina. Já na forma malonilglucosídeo, elas são chamadas de 6-O-malonilgenistina, 6-O-malonildaidzina e 6-O-malonilglicitina (LIU, 1997). Do total de isoflavonas, dois terços são de glicosídeos conjugados de genisteína, sendo o restante composto de conjugados de daidzeína e pequenas quantidades de gliciteína. Já nos produtos fermentados de soja, predominam a genisteína e a daidzeína, em virtude da ação de glicosidases bacterianas. Sendo assim, a maior parte das farinhas de soja e dos concentrados protéicos que são utilizados na indústria de alimentos contém isoflavonas em concentrações variadas (de 0,5 a 3,0 mg/g) (SETCHELL, 1998).

WANG e MURPHY (1994a) determinaram o conteúdo de isoflavonas em diversas variedades americanas e japonesas de soja e concluíram que este depende de variações genéticas, do ano de produção e do local de crescimento, sendo o efeito do ano de produção maior que o da localização. No Quadro 1 está o conteúdo de isoflavonas de alguns produtos de soja.

Quadro 1 – Conteúdo médio de isoflavonas de alguns produtos de soja

Isoflavonas	Grão de Soja, Brasil	Farinha de Soja	Isolado Protéico	Concentrado Protéico	Tofu
	-----mg/100g-----				
Daidzeína	20,16	71,19	33,59	43,04	14,29
Genisteína	67,47	96,83	59,62	55,59	16,38
Gliciteína	nd	16,18	9,47	5,16	5,00
Total	87,63	177,89	97,43	102,07	33,17

Fonte: USDA, 1999; nd = não determinado.

Nas últimas décadas, tem havido um grande interesse nos isoflavonóides e, em particular, nos potenciais benefícios que uma dieta rica nestes compostos pode conferir no controle de muitas doenças crônicas. O maior interesse dos pesquisadores é na farmacologia e fisiologia das isoflavonas, pois apresentam estrutura não-esteroidal, mas se comportam como estrógenos na maioria dos sistemas biológicos, além de serem os mais abundantes dentre os fitoestrógenos. Em adição à sua atividade anti-estrogênica, esses compostos possuem amplas propriedades biológicas (atividade antioxidante, inibição da atividade enzimática, atividade antifúngica e outras), que podem exercer impacto em muitos processos bioquímicos e fisiológicos (SETCHELL, 1998).

Existem ainda, como constituintes da soja, enzimas que fazem parte do metabolismo químico do vegetal, como as peroxidases, as lipoxigenases e as beta-glucosidases, que são as principais enzimas investigadas no processo de branqueamento.

A peroxidase (hidrogênio peroxidase redutase, EC.1.11.1.7.) é utilizada como indicador de branqueamento de muitos vegetais, por causa de sua termoestabilidade (LEE et al., 1988). A inativação da peroxidase pelo aquecimento tem se apresentado como um processo bifásico, provavelmente em razão da existência de isoenzimas com diferentes estabilidades térmicas (HALPIN et al., 1989). Convencionalmente, alguns investigadores têm utilizado, no processo de branqueamento de vegetais, a destruição da enzima peroxidase como indicador ideal de tratamento térmico (LIU, 1997).

As lipoxigenases (linoleato oxigênio óxido-redutase, EC.1.13.11.12) são dioxigenases que catalisam a hidroperoxidação de ácidos graxos poliinsaturados livres ou esterificados, que contenham grupos cis e cis-1,4 pentadieno, utilizando o oxigênio molecular e produzindo 9 ou 3-cis, transperóxidos, que geralmente se decompõem em ácidos, aldeídos e cetonas de cadeia carbônica curta. Elas são de particular interesse porque têm sido implicadas como a principal causa dos sabores e aromas indesejáveis, associados aos produtos de soja (LIU, 1997). Os aldeídos e as cetonas mencionados são responsáveis pelo odor característico existente em produtos derivados de soja (LEONI et al., 1985).

Dentre os compostos formados pela oxidação dos ácidos graxos, os aldeídos são os mais sensíveis à percepção sensorial em alimentos. Estes compostos, além de produzirem sabores desagradáveis, podem interagir com proteínas e peptídeos, provocando o escurecimento dos produtos e comprometendo seu valor nutricional (KAIBRENER et al., 1974; GARDNER, 1979; RACKIS et al., 1979). Nos grãos de soja, as lipoxigenases constituem cerca de 1% do total de proteínas contidas no grão. Geralmente, são encontradas pelo menos três isozimas lipoxigenases (LOX₁, LOX₂ e LOX₃) na maioria dos cultivares comerciais de soja.

As atividades das isozimas lipoxigenases podem ser medidas espectrofotometricamente por absorção em comprimento de onda específico, ou medindo-se o consumo de O₂ com eletrodo de oxigênio (AXELROD et al., 1981). Dentre as três lipoxigenases, LOX₁ é a que apresenta maior atividade *in vitro* e maior estabilidade térmica (CHRISTOPHER et al., 1970, 1972); portanto, é de se esperar que variedades de soja com baixa atividade de LOX₁ forneçam produtos derivados mais estáveis e, conseqüentemente, com melhores propriedades sensoriais (BARROS et al., 1984).

As três isozimas lipoxigenases têm pesos moleculares próximos de 100.000 dáltons. Utilizando o ácido linoléico como substrato, verifica-se que a LOX₁ tem pH ótimo em torno de 9,5, a LOX₂ o tem em torno de 6,5 e a LOX₃ tem uma faixa de pH bastante ampla, que vai de 4,5 a 9,0 (HILDEBRAND e HYMOWITZ, 1981). Os pontos isoelétricos das três isozimas também são diferentes entre si, sendo as formas LOX₁ e LOX₃ a mais ácida e a menos ácida, respectivamente (CHRISTOPHER et al., 1972; DIEL e STAN, 1978; KITAMURA, 1984). Com relação à especificidade pelo substrato, LOX₁ é mais reativa com ácido linoléico, ao passo que LOX₂ e LOX₃ são mais reativas com metilinooleato ou trilinoleína (Bild et al., 1977, citados por HILDEBRAND e KITO, 1984).

Por ser a ação das lipoxigenases a causa mais importante dos *off flavors* em produtos de soja, inúmeras tentativas para melhorar o sabor e o aroma desses produtos têm focado métodos de inativação ou inibição de tais enzimas. A maioria dos métodos desenvolvidos comercialmente faz uso da sensibilidade ao calor dessas enzimas. Contudo, a utilização de calor suficiente para inativar as lipoxigenases, freqüentemente, conduz à insolubilização das

proteínas, à perda da sua funcionalidade e à introdução de sabor cozido ou torrado. Além do mais, a inativação pelo calor só é totalmente efetiva se o grão estiver intacto (LIU, 1997).

Dessa forma, nos últimos 15 anos, tentativas de melhoria da qualidade sensorial dos produtos de soja por meio de manipulação genética têm sido feitas. Uma das alternativas é o desenvolvimento de novas variedades com baixo conteúdo de ácido linolênico. Entretanto, o efeito desta modificação no controle do *beany flavor* parece não ser significativo. Outra alternativa é o desenvolvimento de variedades sem uma ou mais lipoxigenases. Esta modificação tem se mostrado eficaz na redução da atividade de lipoxigenases nas sementes de soja e no controle do desenvolvimento do *off flavor* do produto final (LIU, 1997).

2.3. Regulação do metabolismo do colesterol

A regulação do metabolismo do colesterol é a combinação da regulação da sua síntese endógena e a regulação da síntese de ácidos biliares, que é o modo predominante de excreção de esteróides do corpo (ZUBAY, 1999).

2.3.1. Regulação da biossíntese de colesterol

O colesterol é sintetizado principalmente no fígado, mas também nas paredes intestinais, no córtex adrenal, na pele, nos testículos e na aorta (GARRETT e GRISHAM, 1999). O precursor da síntese de esteróides é a acetil-coenzima A, uma molécula produzida durante o metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios. Existem, no mínimo, 21 passos na via biossintética do colesterol (ZUBAY, 1999). No primeiro passo, o mevalonato é formado e a série de reações envolvidas é catalisada por enzimas microssomais, das quais a mais importante é a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (EC 1.1.1.34;HMGR), pois é a enzima limitante da síntese do colesterol. A partir deste ponto, por meio de uma série de reações de condensação, o mevalonato é transformado em hidrocarboneto de cadeia

longa (esqualeno), que é ciclizado e transformado em colesterol por meio de uma seqüência de várias reações (STIPANUK, 2000).

Em adultos de peso normal, a síntese diária de colesterol varia de 800 a 1.200 mg, sendo normalmente um terço desta síntese convertido em ácidos biliares no fígado (ZUBAY, 1999).

Em muitas espécies animais a síntese de colesterol é inibida pelo colesterol da dieta, por meio de mecanismo de retroalimentação negativa (STIPANUK, 2000). GRUNDY e AHRENS (1969) mostraram que a inibição da absorção de colesterol estimulou sua síntese hepática em homens. Estudos também evidenciam que, quando o colesterol da dieta é aumentado, sua síntese em todo o organismo é reduzida em grande parte dos indivíduos (GRUNDY, 1983). A elevada ingestão de energia, em alguns casos associada à obesidade, aumenta a atividade da HMGR, ocorrendo superprodução de colesterol. Alguns componentes da fibra da dieta podem se ligar aos ácidos biliares, aumentando sua excreção e estimulando a colesterogênese para substituir o *pool* de ácidos biliares (REISER et al., 1977). Por outro lado, a degradação das fibras solúveis pela flora intestinal produz ácidos graxos de cadeia curta no cólon, que podem inibir a síntese hepática de colesterol (ANDERSON, 1987).

Contudo, a regulação primária da biossíntese de colesterol parece estar centrada na reação controlada pela HMGR. Esta enzima é uma glicoproteína encontrada no retículo endoplasmático (RE), tem peso molecular de 97.092, consiste de 887 aminoácidos em uma única cadeia polipeptídica e tem dois domínios. O domínio aminoterminal tem peso molecular de 35.000, com sete segmentos hidrofóbicos que atravessam a membrana do RE. O domínio carboxilterminal tem peso molecular de 62.000, contém o sítio catalítico da enzima e está voltado para o citosol (GARRETT e GRISHAM, 1999).

A atividade da HMGR é regulada por três mecanismos diferentes. O primeiro ponto de controle ocorre em nível de expressão de genes. A quantidade de mRNA produzida é modulada pelo suprimento de colesterol. Quando o colesterol está em excesso, a quantidade de mRNA para HMGR é reduzida, e então menos enzima é produzida. A depleção de colesterol aumenta a síntese de mRNA para a enzima. O segundo mecanismo regulatório

envolve a taxa de degradação da HMGR. Sabe-se que a meia-vida dessa enzima está entre 2 e 4 horas, cerca de dez vezes menor do que a da maioria das proteínas do RE. Então, a HMGR é rapidamente degradada na célula. A taxa de degradação da redutase parece ser modulada também pelo suprimento de colesterol, portanto, quando o colesterol está abundante, a taxa de degradação da enzima é duas vezes mais rápida do que quando o suprimento está limitado. O terceiro mecanismo regulatório é a fosforilação/desfosforilação da redutase, o que causa a inativação e ativação da enzima (ZUBAY, 1999). A fosforilação da enzima por uma proteína quinase dependente de AMP cíclico (cAMP), inativa a redutase, o que pode ser revertido por fosfatases, as quais ativam a redutase (GARRETT e GRISHAM, 1999).

A biossíntese de colesterol pode ser também controlada pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL). As LDL são as maiores transportadoras de colesterol do fígado para os tecidos periféricos. Elas são degradadas dentro dos lisossomos pela ação de proteases e lipases ácidas, liberando o colesterol ou os derivados de colesterol, os quais se difundem através da membrana lisossomal, inibem a atividade da HMGR e estimulam a atividade da acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT), que catalisa a formação de ésteres de colesterol, que são estocados dentro das células (ZUBAY, 1999).

Os ácidos biliares podem também ser o principal mediador da síntese de colesterol hepático e intestinal. Em humanos, a síntese de colesterol na mucosa é inibida pela presença de ácidos biliares, e a absorção de sais biliares reduz o total de colesterol sintetizado pelo organismo (STIPANUK, 2000). Segundo GARRETT e GRISHAM (1999), a síntese de colesterol hepático pode ser influenciada pelos ácidos biliares, por meio de três vias: i) o aumento de ácidos biliares no intestino suprime a síntese de colesterol e a sua deficiência, por outro lado, tem efeito oposto, levando a uma síntese aumentada; ii) os ácidos biliares suprimem sua própria síntese a partir do colesterol e podem, portanto, aumentar a concentração de colesterol hepático; este mecanismo pode reduzir a síntese por meio da inibição por retroalimentação pelo próprio colesterol; e iii) os ácidos biliares podem interferir diretamente em algumas vias na biossíntese de colesterol, mas estes mecanismos são questionados por outros pesquisadores.

2.3.2. Regulação da biossíntese de ácidos biliares

Os ácidos biliares são sintetizados a partir do colesterol no fígado e secretados na bile. Os ácidos biliares são encontrados principalmente como sais biliares, são derivados ácidos, carboxílicos e polares do colesterol e são também importantes na digestão de lipídios (GARRETT e GRISHAM, 1999).

A bile é composta de colesterol, fosfolipídios e ácidos biliares. Estes últimos agem como detergentes no lúmen intestinal, para facilitar a absorção do colesterol dietético e biliar, assim como de outros lipídios e vitaminas lipossolúveis. Os ácidos biliares são quase quantitativamente reabsorvidos do intestino e retornam ao fígado via circulação venosa portal. A reabsorção intestinal dos ácidos biliares ocorre passivamente ao longo do intestino e ativamente no íleo. A reabsorção hepática dos ácidos biliares também ocorre via transporte ativo. Após retornarem ao fígado, os ácidos biliares podem ser novamente metabolizados, conjugados e secretados na bile (circulação êntero-hepática). Eles são reabsorvidos via circulação êntero-hepática seis vezes por dia (duas vezes após cada refeição), aproximadamente. Os ácidos biliares que não são reabsorvidos são excretados nas fezes (BUHMAN, 1998). Sendo assim, a conversão de colesterol em ácidos biliares é, quantitativamente, o mais importante mecanismo de degradação e de excreção de colesterol do corpo (ZUBAY, 1999). Outra via de degradação e excreção do colesterol hepático é a sua secreção na bile. O colesterol biliar, liberado no intestino junto com o colesterol da dieta, é reabsorvido em torno de 30 a 60%. O restante passa para o cólon, é transformado pela flora bacteriana nos esteróides neutros: coprostanol e coprostanona, e, em seguida, são excretados nas fezes (LINSCHER e VERGROESEN, 1998).

A primeira etapa para conversão do colesterol em ácidos biliares primários, cólico e quenodeoxicólico, é a formação da 7- α -hidroxicolesterol (Figura 1), sob a influência da enzima limitante colesterol 7- α -hidroxilase (EC 1.14.13.17; CYP7A) (GARRETT e GRISHAM, 1999). Os ácidos biliares primários, após serem conjugados com glicina e taurina, são secretados na bile e passam através do trato biliar para o duodeno. Aproximadamente 98% dos ácidos biliares são reabsorvidos, via circulação portal, retornando ao fígado, onde são secretados na bile para completar a circulação êntero-hepática

(CEH). O *pool* de ácidos biliares é reciclado de seis a dez vezes/dia em humanos (LINSCHER e VERGROESEN, 1998). Diferentes espécies produzem diferentes padrões de ácidos biliares primários; entretanto, em humanos, hamsters e ratos o principal ácido biliar primário é o quenodesoxicólico (GARRETT e GRISHAM, 1999).

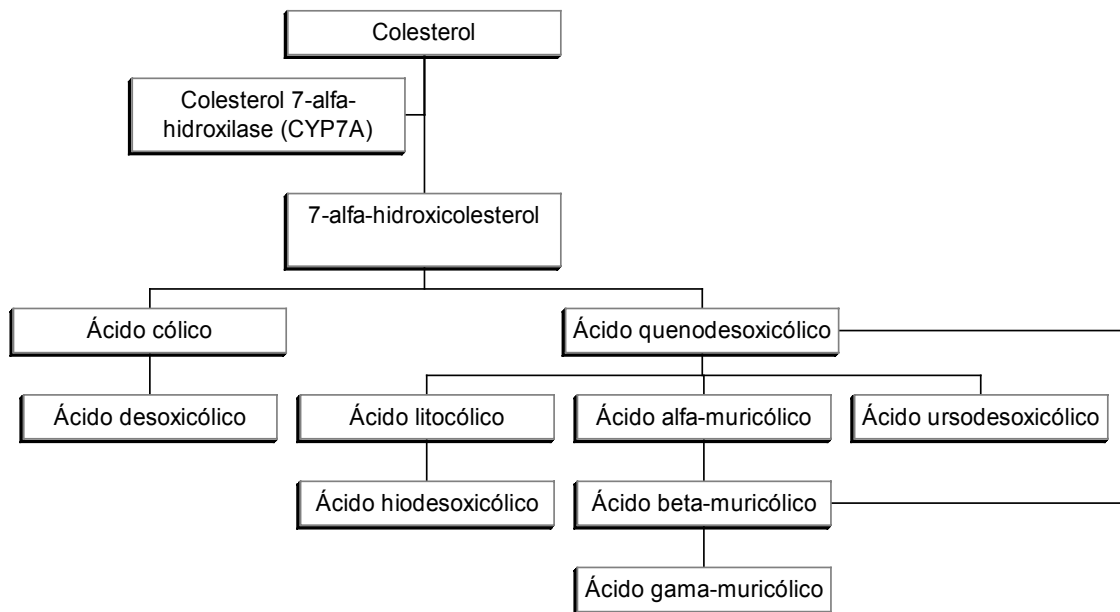


Figura 1 – Síntese e metabolismo dos ácidos biliares em ratos.

Pequenas quantidades de ácidos biliares não são absorvidas durante cada ciclo da circulação êntero-hepática. Estes passam para o intestino grosso, e, sob ação das colônias de microrganismos, os grupos glicina e taurina são removidos do grupo 7- α -hidroxil, produzindo ácidos biliares secundários, desoxicólico e litocólico, a partir de ácidos cólico e quenodeoxicólico, respectivamente. Estes podem ser absorvidos no cólon e retornar ao fígado via veia porta. No fígado, podem ser adicionalmente metabolizados e, ou, reconjugados e secretados na bile como ácidos biliares primários. Cerca de 0,5 g de ácidos biliares é excretado diariamente nas fezes (LINSCHER e VERGROESEN, 1998).

Os ácidos biliares, ao retornarem ao fígado após reabsorção intestinal, inibem a síntese hepática de novos ácidos biliares. Qualquer substância capaz de reduzir a reabsorção destes compostos promoverá maior conversão de colesterol em ácidos biliares (SANTOS e SANTOS, 1989).

A regulação desse processo ocorre no passo biossintético inicial catalisado pela CYP7A, que se localiza no retículo endoplasmático (STIPANUK, 2000). A CYP7A é uma citocromo P450 monoxigenase hepática que introduz um grupo hidroxil no carbono 7 do colesterol, na posição axial. A subsequente conversão de 7-hidroxicolesterol em ácido cólico, que é um dos principais ácidos biliares humanos, envolve uma série de reações (oxidação, redução, isomerização e hidroxilação) (ZUBAY, 1999).

A CYP7A apresenta variação diurna e sua atividade catalítica é regulada por fatores dietéticos, hormonais e por algumas drogas. O suprimento de colesterol aumenta a atividade da enzima em ratos (SHEFER et al., 1992; HORTON et al., 1995), mas diminui em coelhos (XU et al., 1998), em hamsters (HORTON et al., 1995) e em macacos africanos (RUDEL et al., 1994). As razões para tais diferenças entre espécies ainda não estão completamente elucidadas. Existe ainda um possível controle da atividade dessa enzima pelo fluxo êntero-hepático de ácidos biliares (NGUYEN et al., 1996). Tem sido demonstrado que sua atividade é aumentada quando os ácidos biliares estão reduzidos na circulação êntero-hepática de ratos e inibida quando o excesso de ácidos biliares está presente. Estudos mais recentes têm evidenciado que a atividade da CYP7A pode ser regulada pós-transcricionalmente por mecanismos que envolvem fatores citosólicos, ligações dissulfídicas na estrutura da enzima e fosforilação/desfosforilação (NGUYEN et al., 1996).

2.4. Efeito hipocolesterolemia da soja

Uma das principais causas de morte em muitos países desenvolvidos têm sido as doenças do coração e dos vasos sanguíneos, coletivamente conhecidas como doenças cardiovasculares (DCV). Nos Estados Unidos, as taxas de morte por doenças cardiovasculares em homens com idade entre 35 e 50 anos são três vezes maiores que em mulheres da mesma idade, e nos anos

mais tardios (entre 65 e 74) a incidência é similar para ambos os sexos (WHITNEY e ROLFES, 1999).

A substituição da proteína animal por proteína vegetal parece estar associada à redução do risco de doenças cardiovasculares, e este efeito é refletido principalmente pela redução das concentrações de colesterol sérico. O efeito hipocolesteremiante da proteína de soja, quando comparado ao da proteína animal, tem sido observado por mais de 80 anos em animais (ANDERSON et al., 1999a).

CHO et al. (1985) demonstraram ligeiro efeito aditivo da proteína e da casca de soja na redução da concentração de colesterol sangüíneo em porcos que consumiam dietas adicionadas de colesterol.

POTTER et al. (1993a) verificaram que a adição de 50 g de isolado protéico de soja/dia, via produtos de padaria, em uma dieta pobre em lipídios e colesterol reduziu os níveis de colesterol total e LDL-colesterol, juntamente com os de apo B, em homens com hipercolesterolemia moderada. Porém, não foi observado efeito adicional em humanos que consumiam fibra de cotilédone de soja com proteína de soja.

BAKHIT et al. (1994) realizaram estudo com 31 homens portadores de hipercolesterolemia moderada, consumindo dieta com baixo teor de lipídios (<30% de energia) e colesterol (<300 mg/dia), acrescida de biscoitos que forneciam 25 g de proteína e 20 g de fibra/dia. Os biscoitos eram preparados de isolado protéico de soja (ISP) com fibra de cotilédone da soja (FCS), de IPS com celulose, de caseína com FCS e de caseína com celulose, oferecendo a cada grupo o mesmo teor de proteína e fibra. Após quatro semanas, analisaram-se as frações de colesterol, triacilglicerídios, apo A-I e apo B de todos os grupos, tendo sido verificado que o tratamento dietético não influenciou a lipidemia. Entretanto, em indivíduos com concentração de colesterol acima de 220 mg/dL, a dieta com IPS reduziu o colesterol total, comparado com os dois grupos com caseína. A redução da LDL-colesterol não foi estatisticamente significativa, enquanto a VLDL-colesterol foi significativamente reduzida. A HDL-colesterol também foi reduzida significativamente com a dieta de FCS, quando comparada com a de celulose. O colesterol total, a LDL-colesterol e a apo A-I foram reduzidos com uso de FCS com caseína, enquanto a apo B não foi afetada pelos tratamentos

dietéticos. Esses resultados indicam que o consumo de 25 g de proteína de soja/dia está associado com a redução dos níveis de colesterol, quando sua concentração inicial é superior a 220 mg/dL, e parece que a proteína de soja afeta o metabolismo de colesterol, possivelmente via sistema endócrino, enquanto a fibra de soja parece agir interrompendo a circulação êntero-hepática.

KUROWSKA e CARROL (1994) verificaram que a presença de caseína ou de aminoácidos da caseína na dieta produz elevação na colesterolemia, em coelhos. Os aminoácidos essenciais da caseína são mais eficazes em elevar a concentração de colesterol total e LDL-colesterol do que os aminoácidos não-essenciais. Portanto, ao testar o grupo com aminoácidos essenciais, os autores verificaram que a lisina e a metionina são mais hipercolesterolemiantes e que a arginina age contra o efeito desses aminoácidos essenciais.

ANDERSON et al. (1995) realizaram uma metaanálise para avaliar os efeitos da proteína de soja nas concentrações de lipídios séricos. Verificaram que dietas que continham proteína de soja, comparadas com dietas de caseína, levaram a uma significativa redução na concentração sérica de colesterol total, LDL-colesterol e triglicerídios. De 38 estudos revistos por esses autores, em 34 ficou evidenciada a redução nos níveis de colesterol total em torno de 9,3% e em quatro verificou-se elevação. Desses 38 estudos, em 31 foram analisados os níveis de LDL-colesterol, em 26 observou-se redução em torno de 13%, em quatro deles houve aumento e em um estudo não houve nenhuma mudança. Os níveis de HDL-colesterol nesses estudos não foram afetados significativamente, entretanto observou-se aumento de 2,4% em 30 dos 38 estudos analisados. Os níveis de VLDL-colesterol não foram estatisticamente afetados pela proteína de soja. Desses 38 estudos, em 30 foram analisados os níveis de triglicerídios e verificou-se que o consumo de proteína de soja reduziu significativamente a concentração destes em 10,5%, com 22 mostrando redução e oito mostrando aumento na concentração sérica. Neste mesmo estudo, mudanças na concentração de colesterol sérico e LDL-colesterol foram analisadas de acordo com o quartil de concentração inicial de colesterol. Indivíduos com níveis normais de colesterol (abaixo de 200 mg/dL) e hipercolesterolemia branda (de 200 a 255 mg/dL), recebendo dieta de proteína de soja, tiveram redução não-significativa de 3,3 e 4,4%, respectivamente.

Indivíduos com hipercolesterolemia moderada (de 259 a 333 mg/dL) e grave (>335 mg/dL) tiveram redução significativa de 7,4 e 19,6%, respectivamente. Quanto em nível de LDL-colesterol, as mudanças foram similares aos quartis de colesterol sérico inicial, ou seja, no primeiro quartil houve redução de 7,7%, no segundo de 6,8%, no terceiro de 9,8% e no quarto de 24%. Os níveis de HDL-colesterol foram similares em todos os quartis. Mudanças nos níveis de triglicerídios foram significativas apenas na concentração inicial, não havendo alterações nos outros quartis.

CARROL e KUROWSKA (1995) observaram que a hipercolesterolemia e a aterosclerose podem ser produzidas em coelhos alimentados com dieta semipurificada, adicionada de colesterol, e que a hipercolesterolemia foi produzida pela caseína usada na dieta semipurificada, podendo esta ser prevenida ao substituir a caseína pelo isolado protéico de soja.

A quantidade de proteína ingerida tem efeito significativo na concentração de colesterol sérico. BAKHIT et al. (1994) concluíram que indivíduos com concentração elevada de colesterol sanguíneo podem se beneficiar com pequenas quantidades de proteína de soja na dieta. O consumo de 20 g de fibra e 25 g de proteína seria suficiente para produzir tal efeito, o que contrasta com os resultados de inúmeros estudos, que indicam que grandes quantidades são necessárias. ANDERSON et al. (1995) concluíram que o consumo diário de 31 a 47 g de proteína de soja pode reduzir significativamente a concentração de colesterol total e LDL-colesterol. A ingestão de 25 ou 50 g de proteína de soja/dia reduziu a concentração de colesterol sérico em 17 mg/dL. Pessoas com hipercolesterolemia grave ou moderada podem ter grande redução na concentração de colesterol sérico, quando a proteína de soja substituir a proteína animal na dieta.

Enquanto os efeitos cardioprotetores da proteína de soja são bem aceitos, os componentes responsáveis por estes efeitos ainda são assunto de pesquisas constantes. Durante os anos 70 e o início dos anos 80, a composição de aminoácidos da proteína de soja foi investigada pelo seu efeito nos lipídios plasmáticos e no metabolismo de proteínas e pelo seu papel na inibição da aterosclerose (ANDERSON et al., 1999b).

HUFF et al. (1977) alimentaram grupos de coelhos com dietas que continham proteína de soja, caseína ou misturas de aminoácidos que

duplicavam a composição aminoacídica de cada proteína. Para a caseína ou sua mistura, as concentrações dos dois grupos foram essencialmente as mesmas. Entretanto, para a proteína de soja, sua mistura aminoacídica não foi tão hipocolesterolemiantes quanto à proteína intacta, o que forneceu evidência de que existem outros componentes na proteína intacta que promovem a redução das concentrações de colesterol ou interagem com a proteína, para afetar o metabolismo, favoravelmente.

Mais recentemente, evidências têm mostrado que os componentes da soja responsáveis por grande parte de seu efeito cardioprotetor são moléculas extraídas com álcool, como as saponinas, os fitoesteróis e as isoflavonas (SUGANO e KOBA, 1993; BALMIR et al., 1996; ANTHONY et al., 1997; KIRK, et al., 1998; TOVAR-PALACIO et al., 1998). Contudo, POTTER et al. (1993b) observaram que as saponinas não apresentam nenhum efeito hipocolesterolemiantes na presença da proteína de soja. Em adição, a maioria dos isolados protéicos de soja apresentam baixos teores de fitoesteróis, em virtude do processamento para sua obtenção (ANDERSON e WOLF, 1995). As isoflavonas, que são amplamente removidas da proteína de soja quando esta é lavada com álcool, têm sido bastante estudadas, pois alteram as concentrações de lipídios plasmáticos, tanto na presença quanto na ausência da proteína (ANDERSON e GARNER, 1997).

Os mecanismos pelos quais a proteína de soja exerce efeito hipocolesterolemiantes ainda não foram elucidados e têm sido objeto de pesquisa constante (Figura 2). Alguns trabalhos evidenciam que, quando a proteína de soja é administrada, a absorção de colesterol e, ou, a reabsorção de ácidos biliares é alterada. Este fato é observado em algumas espécies, como coelhos e ratos, mas não em humanos. A substituição da proteína intacta por mistura de aminoácidos também apresenta os mesmos efeitos. Outros estudos propõem que as alterações endócrinas, como alterações na taxa insulina:glucagon e concentrações de hormônios tireoideanos, são responsáveis pelo efeito hipocolesterolemiantes. As alterações metabólicas que têm sido observadas quando se administra proteína de soja em uma grande variedade de modelos animais incluem aumento da síntese de colesterol endógeno, aumento da síntese de ácidos biliares (ou excreção fecal destes), aumento da atividade do receptor para apolipoproteína B ou E e diminuição da

secreção de lipoproteínas hepáticas e do conteúdo de colesterol, os quais são associados com a redução nas concentrações sanguíneas do colesterol (POTTER, 1995).

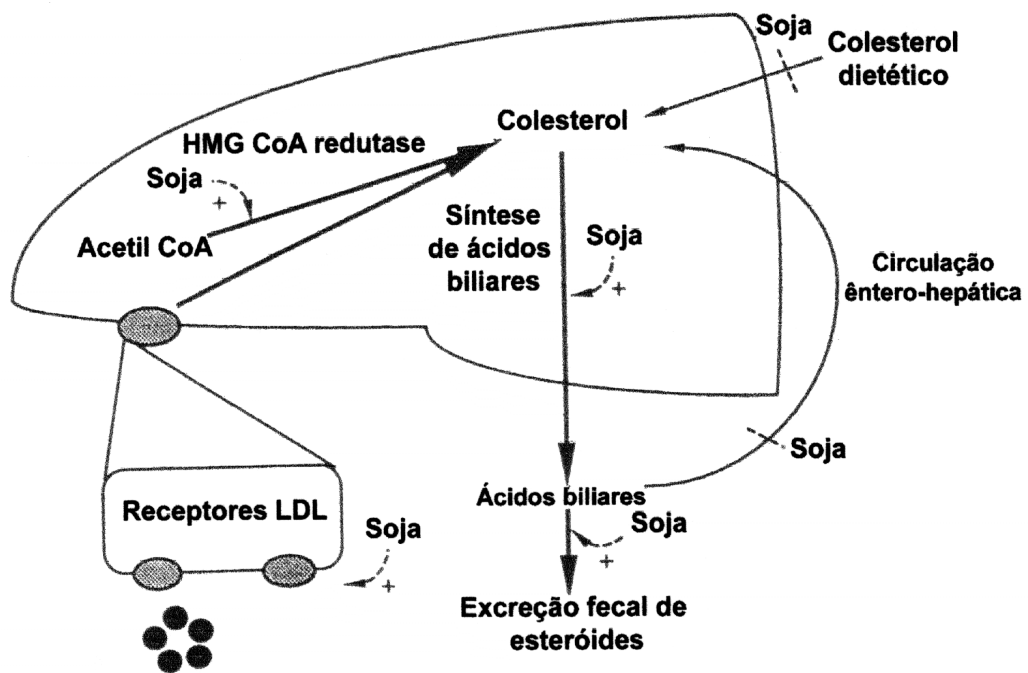


Figura 2 – Possíveis alterações causadas pela proteína de soja no metabolismo do colesterol.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracterização dos cultivares de soja

3.1.1. Linhagem UFV116

A linhagem UFV116 foi desenvolvida pelo Programa de Melhoramento Genético do BIOAGRO - Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa, com o objetivo de obter uma nova variedade com melhor sabor e odor. Os grãos foram produzidos na região de São Gotardo – MG, no ano agrícola 1997/98. Esta é uma linhagem quase isogênica, não possui as enzimas lipoxigenases (LOX) 2 e 3, e foi obtida por retrocruzamento e seleção entre a variedade Cristalina e os acessos sem lipoxigenases 2 (PI 86023) e 3 (Ichigowase). Como os genes que determinam a ausência das LOX 2 e 3 são recessivos, foram obtidos, primeiramente, materiais sem cada isoenzima, separadamente, e depois esses genes foram piramidados em uma única linhagem (UFV116).

3.1.2. Variedade OCEPAR-19

É uma variedade precoce utilizada na indústria de alimentos brasileira, contém todas as isoenzimas LOX (1, 2 e 3) e é cultivada nas regiões do

sudeste brasileiro. Os grãos foram produzidos na região de São Gotardo - MG no ano agrícola 1997/98.

3.2. Produção das farinhas

Os grãos de ambos os cultivares foram fornecidos pela COPADAPI – Cooperativa Agropecuária do Alto Paranaíba, tendo amostras de 30 kg de cada variedade sido utilizadas para produção de farinha integral. As farinhas foram produzidas na Fábrica de Conservas do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.

Após os procedimentos de seleção e lavagem, os grãos foram aquecidos por 10 minutos, a uma temperatura de 80 °C, para a quebra e remoção da casca e inativação dos inibidores de proteases. Em seguida, a casca foi retirada por meio de peneiragem, em peneira de abanar e limpar grãos, e estes foram moídos em moinho de martelo, para obtenção da farinha (GOMES e COELHO, 1989). Ao final, as farinhas foram acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificados e armazenados em refrigerador.

3.3. Composição química

Foram determinados os teores de proteína, lipídios totais, aminoácidos, ácidos graxos e de isoflavonas.

3.3.1. Proteínas

As análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.

O teor de nitrogênio total foi determinado segundo o método semimicro Kjeldahl, descrito pela AOAC (1984), com amostras em triplicata. Usou-se o fator 6,25 no cálculo da conversão do nitrogênio em proteína.

3.3.2. Perfil de aminoácidos

O perfil de aminoácidos foi obtido no Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo - SP.

Para obter o perfil aminoacídico, inicialmente as farinhas de soja foram desengorduradas e submetidas à hidrólise ácida com ácido clorídrico 6N, por 24 horas a $110\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, para quantificação dos aminoácidos: lisina, histidina, arginina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutâmico, prolina, glicina, alanina, cisteína, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina e fenilalanina (MOORE et al., 1958). Para quantificação de triptofano, realizou-se uma hidrólise alcalina com hidróxido de lítio 4N, segundo a técnica descrita por LUCAS e SOTELO (1980). Posteriormente, as amostras hidrolisadas foram filtradas, e alíquotas foram aplicadas nas colunas de troca catiônica do analisador (coluna curta para aminoácidos básicos e triptofano, e longa para aminoácidos ácidos e neutros) e eluídas por diferenças de pH e força iônica (coluna curta pH 5,28 e coluna longa pH 3,25 e, posteriormente, 4,25) (SPACKMAN et al., 1958). O princípio da detecção dos aminoácidos foi por derivatização pós-coluna com ninidrina, formando um complexo colorido que foi quantificado espectrofotometricamente, segundo SPACKMAN et al. (1958) e ALONZO e HIRS (1968).

3.3.3. Lipídios totais

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.

Os lipídios totais foram extraídos com éter de petróleo, em extrator de Soxhlet, conforme procedimento descrito nas Normas Analíticas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

3.3.4. Perfil de ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos foi determinado no Laboratório de Análises Físico-Químicas do BIOAGRO – Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.

A composição em ácidos graxos foi determinada por cromatografia gasosa, seguindo a metodologia descrita por JHAM et al. (1982). Para tal, os lipídios totais foram extraídos das amostras com éter de petróleo, hidrolisados com KOH/MeOH 0,5M e esterificados com HCl/MeOH (4:1 v/v). Em seguida, água foi adicionada e a extração dos ácidos foi feita com 2 x 3 mL de éter de petróleo. A camada orgânica foi evaporada e redissolvida com clorofórmio. Alíquotas de 0,5 µL foram utilizadas para a cromatografia gasosa.

3.3.5. Isoflavonas

O teor de isoflavonas totais e de suas frações foi determinado no Departamento de Ciência de Alimentos e Nutrição Humana da Universidade do Estado de Iowa, IA, E.U.A.

Foram quantificados os teores totais de genisteína, daidzeína, gliciteína e de suas frações agliconas, glucosídeos, malonil e acetil, por meio de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (MURPHY et al., 1999). As isoflavonas totais foram extraídas de 2 g de amostra com acetonitrila e ácido clorídrico 0,1N. Os extratos foram filtrados e os resíduos, após secagem, foram dissolvidos em metanol 80% (específico para HPLC). Uma alíquota foi filtrada, em filtro PTFE de 0,45 µm, e analisada por HPLC dentro de um período de 10 horas da extração, para minimizar a interconversão de malonil-glucosídeos para glucosídeos. Foram utilizados um detector WATERS 991, monitorado de 200 a 350 nm, e um integrador WATERS PDA, para quantificação das isoflavonas.

3.4. Ensaio biológico

O ensaio biológico foi realizado no Departamento de Alimentos e Nutrição da Universidade de Purdue, West Lafayette - IN, E.U.A.

3.4.1. Animais e dietas

Foram utilizados 36 ratos machos da raça *Wistar* (*Harlan Sprague Dawley*, Indianápolis - IN), com pesos iniciais entre 90 e 124 g. Os animais foram colocados em gaiolas individuais e adaptados a um ciclo claro-escuro de 12 horas e em ambiente de temperatura controlada (24 °C), com acesso *ad libitum* às dietas e à água deionizada. Todos os animais foram alimentados por um período de sete dias, com dieta comercial para roedores (*Rodent Laboratory Chow*, Ralston Purina, St. Louis - MO), com o objetivo de se adaptarem às condições ambientais e alimentares. Após o período de adaptação, os animais foram distribuídos, ao acaso, em gaiolas individuais, com seis animais por grupo, e foram alimentados por 28 dias com dietas experimentais, semipurificadas, baseadas na dieta AIN93M (REEVES et al., 1993). A composição centesimal das farinhas de soja utilizadas é apresentada no Quadro 2. Estes resultados serviram de base para o cálculo da composição das dietas experimentais. As dietas continham 14% de proteína oriunda dos dois cultivares, UFV116 (UFV) e OCEPAR-19 (OCP), e da caseína (CAS). Cada dieta foi administrada com (+) e sem a adição de 0,25% de colesterol dietético (CAS, CAS(+), UFV, UFV(+), OCP e OCP(+)), por um período de 28 dias. Nas dietas experimentais, a fonte protéica de soja foi acrescentada às expensas de caseína, tendo os teores de fibra, lipídios e carboidratos sido ajustados de acordo com a composição das farinhas (Quadro 3). O ganho de peso e a ingestão alimentar foram monitorados durante o período experimental. As fezes foram coletadas nas últimas 72 horas do período experimental, liofilizadas e congeladas. Ao final do experimento, os animais foram sacrificados por decapitação, sob anestesia com CO₂. As amostras de sangue e fígado foram coletadas em gelo e estocadas a -20 °C, até o momento das análises.

Quadro 2 – Composição em proteína, lipídio, carboidrato, fibra alimentar (total, solúvel e insolúvel), umidade e cinza das farinhas de soja

Componente Analisado	Farinha de Soja, Integral (g/100g)	
	UFV116	OCEPAR-19
Proteína	39,37	37,83
Lipídio	20,83	22,57
Carboidrato total	22,98	25,06
Fibra alimentar insolúvel*	0,83	0,55
Fibra alimentar solúvel*	1,28	1,55
Fibra alimentar total*	2,11	2,10
Umidade*	8,09	8,13
Cinza*	6,62	4,30

*Dados não-publicados.

Quadro 3 – Composição das dietas experimentais

Ingredientes	CAS	Dietas*	
		UFV	OCP
		-----g/kg de dieta-----	
Caseína	140,0	0,0	0,0
Farinha de soja	0,0	350,0	370,0
Amido de milho	420,0	291,1	282,1
Dextrose	155,0	155,0	155,0
Sacarose	100,0	100,0	100,0
Celulose	50,0	42,6	42,6
Óleo de soja	85,0	12,0	1,0
Mix mineral	35,0	35,0	35,0
Mix vitaminas	10,0	10,0	10,0
L-cistina	1,8	1,8	1,8
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5
Total	1.000	1.000	1.000

*CAS = dieta à base de caseína, UFV = dieta à base de UFV116 e OCP = dieta à base de OCEPAR-19; cada dieta foi administrada com e sem a adição de 0,25% de colesterol.

3.5. Análises de colesterol

As análises foram realizadas no Departamento de Alimentos e Nutrição da Universidade de Purdue, West Lafayette - IN, E.U.A., tendo as concentrações sangüíneas e hepáticas de colesterol sido determinadas mediante o uso do método o-phtalaldeído de RUDEL e MORRIS (1973).

Para o colesterol sérico, amostras de soro foram saponificadas com hidróxido de potássio 33% e etanol 95%, e o colesterol foi extraído com hexano. Após a evaporação do hexano, o reagente o-phtalaldeído foi adicionado, formando um complexo colorido, e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente. Adicionou-se, então, ácido sulfúrico concentrado, e a quantificação foi realizada espectrofotometricamente, a 550 nm.

Para o colesterol hepático, amostras de 1 g de fígado foram trituradas e os lipídios foram extraídos com clorofórmio:metanol 2:1. Após filtragem, seguiu-se o mesmo procedimento utilizado para o colesterol sérico.

Em ambas as análises, utilizou-se uma curva-padrão para obter as concentrações nas amostras.

3.6. Isolamento e quantificação de mRNA para 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase e colesterol 7 α -hidroxilase

Estas análises foram realizadas no Departamento de Ciência Animal da Universidade de Purdue, West Lafayette - IN, E.U.A.

Amostras de aproximadamente 1 g de fígado foram trituradas e suspensas em solução de tiocianato de guanidina 4M, citrato de sódio 25 mM (pH 7,4), sarcosyl 0,5% e β -mercaptoetanol 0,1 M e, em seguida, homogeneizadas e congeladas em nitrogênio líquido. Após a extração do RNA total das amostras (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987), realizou-se a análise de *Northern blot* (SAMBROOK et al., 1989; TSANG et al., 1993). O RNA total (aproximadamente 20 μ g/banda) foi separado por eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1%, tendo a integridade das bandas sido verificada mediante o uso de brometo de etídio. O gel foi lavado com solução de acetato de amônio e transferido para uma membrana de náilon (*Genescreen* - DuPont, NEN Boston, MA), por ação capilar. Após esta etapa, as membranas foram

então expostas à radiação ultravioleta, para fixação das bandas, e colocadas em estufa a 80 °C, para remover formaldeído. A hibridização com cDNA para 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGR) marcado com ^{32}P (sonda de DNA) foi conduzida, e as bandas foram auto-radiografadas em filme *Kodak X-Omat AR* (Rochester - NY), a – 80 °C. As membranas foram, então, lavadas em solução de cloreto de sódio e citrato de sódio a 0,1x (SSC 0,1x) e sulfato duodecil de sódio a 1% (SDS 1%), a 100 °C, por 1 hora, e reibridizadas com cDNA para colesterol 7- α -hidroxilase (CYP7A). Após nova lavagem, as variações durante a transferência ou separação no gel foram determinadas, reibridizando-se as membranas com cDNA de rRNA de rato (18S). As sondas de DNA utilizadas foram gentilmente doadas pelo professor Shawn S. Donkin, do Departamento de Ciência Animal da Universidade de Purdue, West Lafayette - IN, E.U.A. Os níveis de mRNA foram quantificados, escaneando-se os auto-radiogramas com scanner *Microtek ScanMaker E3* (Redondo Beach, CA), o qual foi usado em conjunto com os *softwares Adobe Photoshop 4.0* (Adobe System, San Jose, CA) e *Sigma Gel* (Sigma), tendo eles sido expressos como unidades relativas de mRNA para HMGR ou CYP7A por unidade de rRNA 18S.

3.7. Análises de esteróides fecais

Estas análises foram realizadas no Departamento de Alimentos e Nutrição da Universidade de Purdue, West Lafayette - IN, E.U.A.

Os esteróides fecais foram quantificados pelo método de CHEZEM e STORY (1997). Os esteróides foram extraídos de amostras de 0,5 g de fezes liofilizadas com ácido 5 β -colânico e 5 α -colestane, como padrões internos para esteróides ácidos e esteróides neutros, respectivamente. Após a desconjugação dos ácidos biliares, utilizando colilglicina hidrolase, os esteróides neutros foram extraídos com éter de petróleo e os ácidos biliares com dietiléter e etilacetato. A quantificação dos trimetilsililéteros foi realizada por cromatografia gasosa (Hewlett Packard, Cincinatti, OH), utilizando coluna capilar de 30 m DB 1701 (J&W Scientific, Folsom - CA), para os esteróides neutros, e coluna capilar de 30 m DB5 (J&W Scientific, Folsom - CA), para os ácidos biliares.

3.8. Análises estatísticas

Amostras de cada farinha foram analisadas quanto aos seus teores de proteína, lipídio, aminoácidos, ácidos graxos e isoflavonas, em três repetições, e as médias dos resultados para cada componente quantificado foram comparadas, entre os dois cultivares, por meio de teste *t* para amostras independentes.

O ensaio biológico foi realizado segundo um delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos (dietas) e seis repetições (animais) por grupo de tratamento, consistindo em um arranjo fatorial 3 x 2. Este arranjo correspondeu a três tipos de proteína (caseína, proteína do cultivar UFV116 e proteína do cultivar OCEPAR-19) e dois níveis de adição de colesterol dietético (0 e 0,25%). Os dados foram analisados por meio de ANOVA ($p < 0,05$), e os resultados foram comparados por análise de contrastes ($p < 0,05$ e $p < 0,10$). Comparou-se o cultivar UFV116 com o OCEPAR-19, com e sem a adição de colesterol (UFV₍₊₎ x OCP₍₊₎ e UFV x OCP), para verificar se o novo cultivar teria melhor efeito nos mecanismos de controle do metabolismo do colesterol, em relação a um cultivar comercial, e se a adição de colesterol teria alguma influência, isoladamente. Comparou-se também o efeito da adição de colesterol nos cultivares de soja ([UFV+OCP] x [UFV₍₊₎ + OCP₍₊₎]), para verificar se a adição de colesterol exerceria algum impacto nos efeitos das proteínas vegetais. Comparou-se a caseína com os cultivares de soja, com e sem a adição de colesterol dietético, para verificar os efeitos das proteínas vegetais, conjuntamente, em relação a uma proteína animal [CAS x (UFV+OCP) e CAS₍₊₎ x (UFV₍₊₎ + OCP₍₊₎)].

Todas as análises foram realizadas com o uso do programa *Statistica* (STATSOFT, 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição química

As farinhas de soja utilizadas foram preliminarmente avaliadas quanto aos seus teores de proteínas e aminoácidos, lipídios totais, ácidos graxos e isoflavonas, por serem componentes da soja relacionados às alterações observadas no metabolismo do colesterol. Portanto, diferenças nesses componentes poderiam interferir nos efeitos dos cultivares nos mecanismos de regulação deste metabolismo.

4.1.1. Proteínas e aminoácidos

O cultivar UFV116 apresentou teor de proteína de 39,37 g/100 g de farinha e o OCEPAR-19, 37,83 g/100 g de farinha. Entretanto, estes valores não diferiram estatisticamente entre si (Quadro 4). Segundo LIU (1997), a soja é a maior fonte de proteína vegetal para a nutrição humana e animal em muitos países, devendo-se ressaltar que seu teor varia entre 37 e 44%, em base seca, na maioria dos cultivares. Esta proteína possui alta qualidade nutricional, fornecendo calorias, aminoácidos essenciais e nitrogênio. Sendo assim, ambos os cultivares apresentaram teores condizentes com a literatura, constituindo boas fontes protéicas.

Quadro 4 – Média e desvio-padrão para teor de proteína das farinhas de soja

Componente Quantificado	UFV116	OCEPAR-19	<i>p</i> *
	-----g/100 g-----		
Proteína	39,37 ± 0,34	37,83 ± 0,78	0,1265

*p** = probabilidade pelo teste *t*; valores em negrito são considerados significativos.

As proteínas dos dois cultivares estudados contêm todos os aminoácidos essenciais requeridos para a nutrição humana e animal. Contudo, apesar de não ter havido diferença significativa entre os cultivares quanto ao teor de proteína total, a linhagem UFV116 apresentou maior teor de aminoácidos essenciais, não-essenciais e totais que a variedade OCEPAR-19. Entretanto, as perdas de aminoácidos durante a sua determinação, por causa da hidrólise, podem ter influenciado sua quantificação. Houve diferença significativa entre os cultivares, para os aminoácidos: fenilalanina, treonina, tirosina, ácidos aspártico e glutâmico e glicina, tendo os teores sido maiores para UFV116. Os dois cultivares mostraram teores semelhantes para os demais aminoácidos quantificados (Quadro 5).

Os resultados encontrados para UFV116 e OCEPAR-19, neste estudo, estão próximos aos descritos por USDA (1998) (Quadro 6). ZARCADAS et al. (1994) também encontraram um perfil aminoacídico similar entre um cultivar normal e um novo cultivar rico em proteínas, ocorrendo diferença apenas no conteúdo de valina e 4-hidroxiprolina. O aminoácido mais abundante para ambos os cultivares estudados foi o ácido glutâmico, e os mais limitantes, em ordem decrescente, foram cisteína, triptofano e metionina. Com base em dados gerais, ZARCADAS et al. (1993) também citam que o ácido glutâmico é o mais abundante; os aminoácidos ácidos (Glu e Asp) constituem aproximadamente um quarto do total de aminoácidos presentes, comparado com os aminoácidos básicos (Lys, Arg e Hys), que constituem um quinto. Proporções semelhantes também foram observadas nos dois cultivares avaliados, podendo as diferenças observadas ter ocorrido em razão de diversos fatores, incluindo tipo de processamento, variedade, estação de crescimento e fatores genéticos (Quadro 6).

Quadro 5 – Média e desvio-padrão para teores de aminoácidos das farinhas de soja desengorduradas

Aminoácidos	UFV116 -----g aminoácido/100 g amostra-----	OCEPAR-19	<i>p</i> *
Essenciais			
Cistina	0,72 ± 0,03	0,62 ± 0,06	0,192
Histidina	1,34 ± 0,10	1,34 ± 0,07	0,987
Isoleucina	2,66 ± 0,08	2,32 ± 0,19	0,147
Leucina	4,26 ± 0,23	4,03 ± 0,13	0,348
Lisina	3,25 ± 0,18	2,94 ± 0,18	0,231
Metionina	0,99 ± 0,02	0,93 ± 0,06	0,300
Fenilalanina	3,10 ± 0,11	2,66 ± 0,12	0,062
Treonina	2,20 ± 0,07	1,99 ± 0,07	0,088
Triptofano	0,73 ± 0,00	0,86 ± 0,07	0,118
Tirosina	1,99 ± 0,08	1,76 ± 0,05	0,078
Valina	2,55 ± 0,21	2,32 ± 0,15	0,338
Total de essenciais	23,79 ± 0,10	21,77 ± 0,40	0,020
Não-essenciais			
Alanina	2,36 ± 0,15	2,21 ± 0,01	0,276
Arginina	4,35 ± 0,31	3,78 ± 0,10	0,133
Ácido aspártico	6,24 ± 0,18	5,62 ± 0,05	0,046
Ácido glutâmico	10,51 ± 0,27	9,28 ± 0,08	0,025
Glicina	2,24 ± 0,10	2,03 ± 0,01	0,096
Prolina	2,64 ± 0,01	2,51 ± 0,14	0,331
Serina	2,51 ± 0,09	2,44 ± 0,03	0,405
Total de não-essenciais	30,85 ± 1,10	27,87 ± 0,32	0,067
Total de aminoácidos	54,64 ± 1,20	49,64 ± 0,73	0,037

*p** = probabilidade pelo teste *t*; valores em negrito são considerados significativos.

Quadro 6 – Composição aminoacídica em farinhas de soja

Aminoácidos	Farinha de Soja, Desengordurada		
	UFV116	OCEPAR-19	USDA, 1998
-----g aminoácido/100g amostra-----			
Essenciais			
Cistina	0,72	0,62	0,76
Histidina	1,34	1,34	1,27
Isoleucina	2,66	2,32	2,28
Leucina	4,26	4,03	3,83
Lisina	3,25	2,94	3,13
Metionina	0,99	0,93	0,63
Fenilalanina	3,10	2,66	2,45
Treonina	2,20	1,99	2,04
Triptofano	0,73	0,86	0,68
Tirosina	1,99	1,76	1,78
Valina	2,55	2,32	2,35
Total de essenciais	23,79	21,77	21,20
Não-essenciais			
Alanina	2,36	2,21	2,21
Arginina	4,35	3,78	3,65
Ácido aspártico	6,24	5,62	5,91
Ácido glutâmico	10,51	9,28	9,10
Glicina	2,24	2,03	2,17
Prolina	2,64	2,51	2,75
Serina	2,51	2,44	2,72
Total de não-essenciais	30,85	27,87	28,51
Total de aminoácidos	54,64	49,64	49,71

4.1.2. Lipídios totais e ácidos graxos

A linhagem UFV116 apresentou um teor de lipídios estatisticamente menor que a variedade OCEPAR-19 (Quadro 7).

Quadro 7 – Média e desvio-padrão para teor de lipídios totais das farinhas de soja

Componente avaliado	UFV116 -----g/100g-----	OCEPAR-19 -----g/100g-----	<i>p</i> *
Lipídio	20,83 ± 0,48	22,57 ± 0,19	0,0042

*p** = probabilidade pelo teste *t*, valores em negrito são considerados significativos.

Segundo SHANMUGASUNDARAM et al. (1990), a maioria das variedades de soja, imaturas e verdes, contém teores de 15,58 a 21,80 g/100 g de lipídios em base seca. YAZDI-SAMADI et al. (1977) descreveram que o teor de lipídio aumenta com o desenvolvimento da soja, apresentando, nos primeiros 25 dias após a floração, em torno de 5% e aos 40 dias, 20%, permanecendo constante até a maturação. O alto teor de lipídios encontrado na maioria dos cultivares não constitui uma desvantagem, visto que uma das principais formas de utilização da soja é para a extração de óleos. Sendo assim, os dois cultivares estudados apresentaram teor de lipídios satisfatório, condizente com a literatura, podendo ser amplamente utilizados na indústria de alimentos, para produção de óleos e gorduras comestíveis.

As propriedades funcionais, a estabilidade oxidativa, assim como o valor nutricional dos óleos em geral e de soja em particular, são determinados pela composição em ácidos graxos e configuração geométrica (LIU, 1997). Os cultivares UFV-116 e OCEPAR-19 apresentaram um teor de ácidos graxos saturados totais de 15,19 e 15,24% e de insaturados totais de 84,81 e 84,75%, respectivamente. Desta maneira, mostraram uma relação de ácidos graxos poliinsaturados/saturados semelhante, ou seja aproximadamente 4,2.

O teor dos ácidos palmítico e linoléico foi maior para UFV116 e dos ácidos esteárico, linolênico e oléico foi maior para OCEPAR-19 (Quadro 8).

MORAIS E SILVA (1996) descreveram resultados semelhantes para o cultivar Viçoja (11,25 mg/g de ácido palmítico, 4,37 mg/g de ácido esteárico, 21,86 mg/g de ácido oléico, 55,63 mg/g de ácido linoléico e 6,27 mg/g de ácido linolênico).

De acordo com LIU (1997), a soja é rica em ácidos graxos poliinsaturados, sendo aproximadamente 58% de seu conteúdo formado de ácido linoléico (ômega-6) e apenas 8% de ácido linolênico (ômega-3). Os cultivares UFV116 e OCEPAR-19 apresentaram percentuais desses ácidos próximos aos descritos por esse autor (Quadro 8).

Quadro 8 – Média e desvio-padrão para composição em ácidos graxos dos cultivares de soja

Ácido Graxo	UFV116	OCEPAR-19	p^*
	-----mg/g-----		
Palmítico (16:0)	11,426 ± 0,035	10,630 ± 0,056	0,0000
Esteárico (18:0)	3,762 ± 0,052	4,612 ± 0,0528	0,0000
Oléico (18:1)	21,683 ± 0,142	21,863 ± 0,085	0,0722
Linoléico (18:2)	55,376 ± 0,094	54,860 ± 0,101	0,0003
Linolênico (18:3)	7,752 ± 0,125	8,035 ± 0,082	0,0091

p^* = probabilidade pelo teste t ; valores em negrito são considerados significativos.

O ácido linoléico é membro primário da família dos ácidos ômega-6 (W_6). A partir dele, o corpo humano pode sintetizar outros ácidos ômega-6, como o ácido araquidônico. Já o ácido linolênico é o precursor dos ácidos graxos da família dos ômega-3 (W_3), como os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA). Os ácidos graxos linoléico e linolênico são considerados essenciais porque os mamíferos, incluindo o homem, não podem sintetizá-los. Os cultivares estudados apresentaram uma relação W_6/W_3 de 7,1:1 para UFV116 e 6,83:1 para OCEPAR-19. LIU (1997) relatou que em óleo de soja esta relação encontra-se em torno de 7 a 8:1. Segundo a FAO/WHO (1998), a ingestão diária de W_3 deve representar de 0,4 a 2,0% do total de energia da dieta e a de W_6 , de 4,0 a 10%, e a razão W_6/W_3 deve estar na faixa

de 5:1 a 10:1, utilizando 7% da energia do ácido linoléico. Sendo assim, ambos os cultivares são boas fontes de ácidos graxos insaturados e de ácidos graxos W_6 e apresentaram uma boa relação W_6/W_3 .

4.1.3. Isoflavonas

Os cultivares estudados apresentaram diferenças estatísticas com relação ao conteúdo de isoflavonas. A linhagem UFV116 apresentou teor significativamente maior de glucosídeos e malonil (daidzina e genistina), acetil (genistina) e agliconas (daidzeína, ginesteína, gliciteína), perfazendo um total de 1.499 $\mu\text{g/g}$, quando comparado com a variedade OCEPAR –19, que apresentou um total de 917,5 $\mu\text{g/g}$. Considerando o total disponível na amostra (normalizado), verificou-se que UFV116 apresentou conteúdo total maior, para daidzeína e genisteína, e que não houve diferença entre os dois cultivares com relação à gliciteína (Quadro 9).

É importante considerar que o conteúdo total de isoflavonas apresentado no Quadro 9 não é a soma simples da massa dos 12 isômeros. Concentrações normalizadas de cada isoflavona (daidzeína, genisteína e gliciteína) foram relatadas por WANG e MURPHY (1994b) e MURPHY et al. (1999). Estes valores normalizados foram calculados ao multiplicar a massa de cada isômero (glucosídeo, malonilglucosídeo e acetilglucosídeo) pelo quociente entre seu peso molecular na forma aglicona e seu peso molecular na forma individual, antes de efetuar a soma. Por exemplo, a quantidade de genistina foi multiplicada pela razão 270/432, para dar a quantidade de genisteína livre, representada pela genistina. Os isômeros serão hidrolisados nas formas livres (agliconas) no intestino, antes da absorção. Então, os resultados normalizados estimam a dose efetiva de isoflavonas no alimento (SONG et al., 1998).

Quadro 9 – Média e desvio-padrão para conteúdo de isoflavonas dos cultivares de soja

Isômeros		UFV116	OCEPAR-19	<i>p</i> *
		-----µg/g-----		
Glucosídios	Daidzina	237,50 ± 13,43	74,5 ± 0,71	0,0033
	Genistina	382,00 ± 8,49	325,50 ± 19,09	0,0621
	Glicitina	59,00 ± 7,07	70,00 ± 4,24	0,1999
Malonil-	Daidzina	211,00 ± 1,41	59,50 ± 0,71	0,0001
	Genistina	263,00 ± 5,66	213,50 ± 9,19	0,0230
	Glicitina	27,50 ± 4,95	33,00 ± 2,83	0,3057
Acetil-	Daidzina	32,00 ± 16,97	0,00 ± 0,00	0,1165
	Genistina	40,50 ± 2,12	28,50 ± 0,71	0,0169
	Glicitina	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-
Agliconas	Daidzeína	112,00 ± 1,41	26,50 ± 0,71	0,0002
	Genisteína	124,00 ± 2,83	86,50 ± 7,78	0,0235
	Gliciteína	10,50 ± 0,71	0,00 ± 0,00	0,0023
Total	Daidzeína	381,00 ± 18,38	102,00 ± 0,00	0,0022
	Genisteína	522,50 ± 0,71	418,00 ± 25,46	0,0284
	Gliciteína	63,00 ± 8,49	57,00 ± 2,83	0,4429
Total normalizado	Isoflavonas	966,50 ± 27,58	577,00 ± 28,28	0,0051

*p** = probabilidade pelo teste *t*; valores em negrito são considerados significativos.

WANG e MURPHY (1994a) verificaram que na variedade de soja Pioneer 9111 os isômeros 6-O-malonilgenistina somaram 42% do total, seguido pela genistina, 21%, e por 6-O-malonildaizina, 16%. Em contraste, observaram que o teor das agliconas foi apenas de 2% e que para farinha de soja o perfil de isoflavonas foi semelhante. Nos cultivares estudados, as formas conjugadas dos isômeros também foram predominantes (83% para UFV116 e 86,6% para OCEPAR-19), quando comparadas com os isômeros não-conjugados (17% para UFV116 e 13,4% para OCEPAR-19).

Segundo SONG et al. (1998), o conteúdo de isoflavonas da soja pode variar de acordo com o ano de produção e a variedade, por um fator de três a cinco vezes. A linhagem UFV116 apresentou um conteúdo total de isoflavonas, normalizado, aproximadamente 1,7 vez maior que o da variedade OCEPAR-19. Essa diferença pode ser atribuída às características específicas

de cada cultivar, já que ambos foram provenientes do mesmo ano agrícola e da mesma região de cultivo.

As diferenças encontradas no teor de isoflavonas desses cultivares podem interferir nos seus efeitos fisiológicos, uma vez que estes compostos têm sido relacionados a diversas doenças crônicas, exercendo efeitos benéficos na redução do colesterol sangüíneo, na prevenção a certos tipos de câncer, na redução dos sintomas da menopausa, no controle dos níveis de glicose sangüínea, entre outras. Desta maneira, a linhagem UFV116 apresentou melhor potencial terapêutico, pois, considerando que os valores totais foram normalizados, apresentou maior teor disponível de daidzeína e genisteína, que são as principais isoflavonas com efeitos terapêuticos, relacionados aos processos bioquímicos das doenças crônicas citadas.

4.2. Ensaio biológico

4.2.1. Composição das dietas experimentais

Adicionou-se colesterol às dietas experimentais, pelo fato de inúmeros estudos demonstrarem que a maioria das espécies é sensível a diferentes proteínas dietéticas e que estes efeitos são particularmente notáveis quando os animais são expostos a dietas hipercolesterolêmicas (SIRTORI, et al., 1993). Então, cada dieta foi administrada com e sem a adição de colesterol dietético para se obter um controle negativo de cada uma delas, ou seja, para verificar se a adição de colesterol dietético às dietas influenciaria os efeitos das proteínas testadas. Nas dietas de soja, os teores de fibra, lipídios e carboidratos foram ajustados de acordo com a composição das farinhas, com o objetivo de obter uma composição basal o mais próxima da dieta AIN93M (REEVES et al., 1993). Entretanto, o teor de lipídios foi ajustado para 85 g/kg de dieta, devido à composição lipídica das farinhas. A quantidade de farinha utilizada para suprir a necessidade protéica dos animais forneceu 73 e 84 g/kg de dieta de lipídios para UFV116 e OCEPAR-19, respectivamente. Então, os teores lipídicos de todas as dietas foram ajustados para que fornecessem um aporte semelhante. Sendo assim, todas as dietas experimentais foram

hiperlipídicas, já que apresentaram um teor de lipídios aproximadamente duas vezes maior que o recomendado para a dieta AIN93M (40 g/kg).

4.2.2. Ingestão alimentar, ganho de peso e coeficiente de eficiência alimentar

Os animais alimentados com CAS ganharam mais peso, seguidos pelos animais alimentados com UFV e, por último, por aqueles alimentados com OCP (com e sem a adição de colesterol dietético). Entretanto, as diferenças foram significativas somente quando as dietas à base de proteína animal (CAS) foram comparadas com aquelas à base de proteína de soja (UFV e OCP). Não houve diferença significativa entre as proteínas de soja, e a adição de colesterol dietético não influenciou o ganho de peso (Quadros 10 e 11).

Os grupos da CAS e CAS(+) apresentaram um consumo alimentar maior que o das dietas de soja, com e sem a adição de colesterol dietético, o que reforça o maior ganho de peso nestes grupos. Quando o consumo entre as dietas de soja foi comparado, verificou-se que houve maior consumo nos grupos alimentados com UFV, com e sem a adição de colesterol, o que não influenciou o ganho de peso nestes grupos, mas influenciou o coeficiente de eficiência alimentar (CEA), uma vez que este foi maior para UFV. Este índice, entretanto, foi maior nas dietas de CAS, comparado ao das dietas de soja, quando o colesterol foi adicionado (Quadros 10 e 11). A menor ingestão nas dietas de soja, em relação à caseína, pode ter contribuído para o menor CEA desses animais, ao final do experimento. Entretanto, YADAV e LIENER (1977) relataram que parece não haver nenhuma relação entre a resposta de crescimento à dieta e sua habilidade de influenciar os níveis corporais de colesterol. Então, o menor CEA para as dietas de soja, neste estudo, não foi considerado um fator responsável por qualquer efeito no colesterol sanguíneo desses animais.

Quadro 10 – Valores médios e contrastes para ingestão alimentar (IA), ganho de peso (GP) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) de ratos alimentados com dietas experimentais

Dietas	IA (g/dia)	GP (g)	CEA (%)
CAS	23,89	216,67	29,98
CAS(+)	23,94	225,83	37,51
UFV	22,67	128,33	29,22
UFV(+)	22,05	131,00	32,05
OCP	19,27	91,67	20,20
OCP(+)	19,42	93,67	23,11
Contrastes			
UFV x OCP	*	NS	*
UFV(+) x OCP(+)	*	NS	*
[UFV+OCP] x [UFV(+)+OCP(+)]	NS	NS	NS
CAS x [UFV+OCP]	*	*	NS
CAS(+) x [UFV(+)+OCP(+)]	*	*	*

* Significativo pelo teste F, por contraste, em nível de 5% de probabilidade; NS = não-significativo; CAS = dieta à base de caseína; CAS(+) = dieta à base de caseína + 0,25% de colesterol; UFV = dieta à base do cultivar UFV116; UFV(+) = dieta à base do cultivar UFV116 + 0,25% colesterol; OCP = dieta à base do cultivar OCEPAR-19; e OCP(+) = dieta à base do cultivar OCEPAR-19 + 0,25% colesterol.

Quadro 11 – Grau de liberdade (GL) e quadrado médio dos contrastes para ingestão alimentar (IA), ganho de peso (GP) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) de ratos alimentados com dietas experimentais

Fontes de Variação	GL	-----Quadrados Médios-----		
		IA (g/dia)	GP (g)	CEA(%)
Dietas	2	64,73*	3.281,99*	473,06*
Col	1	0,18	8,69	175,96*
Dietas*Col	2	0,52	980,60*	21,71
Contrastes				
UFV x OCP	1	34,69*	1.658,85	244,09*
UFV(+) x OCP(+)	1	20,81*	277,19	239,74*
[UFV+OCP] x [UFV(+)+OCP(+)]	1	0,33	61,49	49,38
CAS x [UFV+OCP]	1	34,01*	1.888,57*	111,19
CAS(+) x [UFV(+)+OCP(+)]	1	41,00*	4.700,56*	394,50*
Resíduo	30	4,05	130,35	52,79

* Significativo pelo teste F, por contraste, em nível de 5% de probabilidade; NS = não-significativo; CAS = dieta à base de caseína; CAS(+) = dieta à base de caseína + 0,25% de colesterol; UFV = dieta à base do cultivar UFV116; UFV(+) = dieta à base do cultivar UFV116 + 0,25% colesterol; OCP = dieta à base do cultivar OCEPAR-19; e OCP(+) = dieta à base do cultivar OCEPAR-19 + 0,25% colesterol.

4.3. Colesterol sérico e hepático e peso dos fígados

Observou-se que a adição de 0,25% de colesterol à dieta CAS promoveu um aumento nos níveis sanguíneos de colesterol de 9,64% (Quadro 12). Os níveis séricos de colesterol geralmente não aumentam em ratos, apesar do acúmulo de ésteres de colesterol no fígado. Os ratos são resistentes em desenvolver hipercolesterolemia e aterosclerose, possivelmente em virtude de sua capacidade de converter excesso de colesterol dietético em ácidos biliares, sem aumentar as concentrações plasmáticas. De acordo com WILSON (1964), esses animais também tendem a acumular lipídios no fígado, quando recebem dietas adicionadas de colesterol e, ou, ácido cólico.

Entretanto, o teor de lipídios das dietas utilizadas neste estudo foi ajustado para 85 g/kg de dieta, por causa da composição lipídica das farinhas. Sendo assim, as dietas apresentaram teor de lipídios aproximadamente duas vezes maior que o recomendado para a dieta AIN93M, o que também pode ter influenciado os níveis séricos de colesterol. SIRTORI et al. (1993) relataram que uma dieta hiperlipídica, adicionada de colesterol, resulta em hipercolesterolemia moderada em diversas espécies, inclusive no rato. VAN DER MEER e BEYNEN (1987) relataram que a diferença entre as concentrações plasmáticas de colesterol entre várias espécies de animais alimentados com caseína ou proteína de soja é geralmente aumentada na presença de colesterol dietético.

Ao comparar o efeito da adição de colesterol dietético nas dietas de soja conjuntamente (UFV + OCP), observou-se que não houve diferença significativa com relação às concentrações de colesterol sérico. Entretanto, ao comparar as dietas UFV e OCP, independentemente, verificou-se que houve maior redução para a UFV. Por outro lado, a adição de colesterol às duas proteínas não apresentou efeito significativo, o que evidencia que a variedade UFV foi mais eficaz na redução do colesterol sérico somente quando este não foi adicionado à dieta. Os grupos de animais alimentados com caseína apresentaram concentrações de colesterol estatisticamente maiores que os grupos alimentados com as proteínas de soja, devendo-se ressaltar que a adição de colesterol às dietas não alterou esta diferença, o que confirma o efeito hipocolesterolemizante da proteína de soja (Quadros 12 e 13).

Com relação ao colesterol hepático, observou-se maior concentração nos animais alimentados com CAS e CAS(+), tendo CAS(+) apresentado uma concentração 9,27% maior que a de CAS. Comparando CAS com UFV e OCP, conjuntamente, observou-se diferença significativa, o mesmo ocorrendo quando colesterol foi adicionado às dietas, ou seja, as dietas de caseína provocaram maior acúmulo de colesterol hepático, quando comparadas com as dietas de proteína de soja, com e sem a adição de colesterol dietético. Não houve diferença significativa quando se comparou UFV e OCP, e a adição de colesterol não teve influência (Quadros 12 e 13).

Quadro 12 – Valores médios e contrastes para colesterol sérico total (CS) e colesterol hepático total (CH) de ratos alimentados com dietas experimentais

Dietas	CS (mg/dL)	CH (mg/g)
CAS	97,02	6,02
CAS(+)	106,37	8,50
UFV	63,53	3,95
UFV(+)	76,89	4,10
OCP	67,28	3,44
OCP(+)	87,05	4,07
Contrastes		
UFV x OCP	*	NS
UFV(+) x OCP(+)	NS	NS
[UFV+OCP] x [UFV(+)+OCP(+)]	NS	NS
CAS x [UFV+OCP]	*	*
CAS(+) x [UFV(+)+OCP(+)]	*	*

* Significativo pelo teste F, por contraste, em nível de 5% de probabilidade; NS = não-significativo; CAS = dieta à base de caseína; CAS(+) = dieta à base de caseína + 0,25% de colesterol; UFV = dieta à base do cultivar UFV116; UFV(+) = dieta à base do cultivar UFV116 + 0,25% colesterol; OCP = dieta à base do cultivar OCEPAR-19; e OCP(+) = dieta à base do cultivar OCEPAR-19 + 0,25% colesterol.

Quadro 13 – Grau de liberdade (GL) e quadrados médios dos contrastes para colesterol sérico total e colesterol hepático total de ratos alimentados com dietas experimentais

Fontes de variação	GL	-----Quadrados Médios-----	
		Colesterol sérico	Colesterol hepático
Dietas	2	3.281,99*	45,64*
Col	1	8,69	4,04
Dietas*Col	2	980,60*	7,86*
Contrastes			
UFV x OCP	1	1.658,85*	0,04
UFV(+) x OCP(+)	1	277,19	1,28
[UFV+OCP] x [UFV(+)+OCP(+)]	1	61,49	0,34
CAS x [UFV+OCP]	1	1.888,57*	16,13*
CAS(+) x [UFV(+)+OCP(+)]	1	4.700,56*	89,55*
Resíduo	30	126,62	1,46

* Significativo pelo teste F, por contraste, em nível de 5% de probabilidade; NS = não-significativo; CAS = dieta à base de caseína; CAS(+) = dieta à base de caseína + 0,25% de colesterol; UFV = dieta à base do cultivar UFV116; UFV(+) = dieta à base do cultivar UFV116 + 0,25% colesterol; OCP = dieta à base do cultivar OCEPAR-19; e OCP(+) = dieta à base do cultivar OCEPAR-19 + 0,25% colesterol.

Sabe-se que os ratos, quando são alimentados com colesterol, produzem acúmulo deste e de outros lipídios no fígado, o que leva a um aumento de seu peso. No presente estudo, o peso dos fígados e o peso relativo destes (peso do fígado em relação ao peso corporal) foram menores nas dietas de soja, com e sem a adição de colesterol dietético, em comparação com CAS, não tendo sido verificada diferença significativa entre os animais alimentados com os dois cultivares (Quadros 14 e 15). Apesar de as dietas UFV (com e sem adição de colesterol) terem promovido um peso corporal final maior que o das OCP, este fato não se refletiu no acúmulo de colesterol e, possivelmente, de outros lipídios, nos fígados dos animais. Este fato evidencia, mais uma vez, que a resposta de crescimento à dieta tem pouca ou nenhuma influência nos níveis corporais de colesterol.

Quadro 14 – Valores médios e contrastes para peso corporal final (PCF), peso dos fígados (PF) e peso relativo dos fígados (PRF) de ratos alimentados com dietas experimentais por 28 dias

Dietas	PCF(g)	PF (g)	PRF**
CAS	358,67	13,83	3,83
CAS(+)	367,83	15,08	4,10
UFV	273,83	8,55	3,11
UFV(+)	270,50	8,68	3,21
OCP	232,50	7,32	3,14
OCP(+)	234,83	7,83	3,31
Contrastes			
UFV x OCP	*	NS	NS
UFV(+) x OCP(+)	*	NS	NS
[UFV+OCP] x [UFV(+)+OCP(+)]	NS	NS	NS
CAS x [UFV+OCP]	*	*	*
CAS(+) x [UFV(+)+OCP(+)]	*	*	*

** PRF = $PF \times 100 / PCF$; * significativo pelo teste F, por contraste, em nível de 5% de probabilidade; NS = não-significativo; CAS = dieta à base de caseína; CAS(+) = dieta à base de caseína + 0,25% de colesterol; UFV = dieta à base do cultivar UFV116; UFV(+) = dieta à base do cultivar UFV116 + 0,25% colesterol; OCP = dieta à base do cultivar OCEPAR-19; e OCP(+) = dieta à base do cultivar OCEPAR-19 + 0,25% colesterol.

Quadro 15 – Grau de liberdade (GL) e quadrados médios dos contrastes para peso corporal final (PCF), peso dos fígados (PF) e peso relativo dos fígados (PRF) de ratos alimentados com dietas experimentais por 28 dias

Fontes de Variação	GL	-----Quadrados Médios-----		
		PCF	PF	PRF
Dietas	2	53.140,5*	165,18*	2,398
Col	1	66,7	3,61	0,288
Dietas*Col	2	117,5	0,97	0,020
Contrastes				
UFV x OCP	1	5.125,3*	4,56	0,002
UFV(+) x OCP(+)	1	3.816,3*	2,17	0,032
[UFV+OCP] x [UFV(+)+OCP(+)]	1	1,5	0,63	0,113
CAS x [UFV+OCP]	1	44.521,0*	139,24*	2,016*
CAS(+) x [UFV(+)+OCP(+)]	1	53.053,5*	186,32*	2,787*
Resíduo	30	636,0	3,132	0,140

* Significativo pelo teste F, por contraste, em nível de 5% de probabilidade; NS = não-significativo; CAS = dieta à base de caseína; CAS(+) = dieta à base de caseína + 0,25% de colesterol; UFV = dieta à base do cultivar UFV116; UFV(+) = dieta à base do cultivar UFV116 + 0,25% colesterol; OCP = dieta à base do cultivar OCEPAR-19; e OCP(+) = dieta à base do cultivar OCEPAR-19 + 0,25% colesterol.

Sendo assim, pode-se dizer que a linhagem UFV 116 foi mais eficaz na redução do colesterol sérico que a OCP, entretanto ambas reduziram o acúmulo de colesterol no fígado de maneira similar, quando comparadas à CAS, independente da adição de colesterol.

Esse efeito hipocolesterolemiantes em função do consumo de produtos que contêm proteína de soja tem sido mostrado repetidamente em humanos e em vários modelos animais (CARROLL, 1991; ANDERSON et al., 1995; POTTER, 1996; TEIXEIRA et al., 2000). Entretanto, os componentes da proteína de soja responsáveis por tal efeito ainda não estão definidos (POTTER et al., 1998). Neste estudo, é preciso considerar que a proteína de soja não foi utilizada isoladamente, e sim em conjunto com todos os outros componentes da farinha de soja, os quais podem ter exercido impacto no seu efeito hipocolesterolemiantes. Componentes não-protéicos, como fibras, ácido fítico, minerais e isoflavonas, associados com a proteína de soja podem também afetar o metabolismo do colesterol (POTTER, 1995).

Durante os anos 70 e o início dos anos 80, a composição de aminoácidos da proteína de soja foi investigada pelo seu efeito nos lipídios plasmáticos e no metabolismo de proteínas e pelo seu papel na inibição da aterosclerose. Entretanto, os estudos comprovaram que sua mistura aminoacídica não é tão hipocolesterolemiantes quanto a proteína intacta. No presente estudo, as diferenças de efeito observadas entre os cultivares na redução do colesterol não poderiam ser atribuídas à proteína por si só, já que ambas apresentaram conteúdo estatisticamente similar em proteína (39,37 g/100 g para UFV116 e 37,83 g/100 g para OCEPAR-19).

KRITCHEVISKY et al. (1984) sugeriram que o efeito hipocolesterolemiantes da proteína de soja era baseado na sua taxa de lisina/arginina baixa. Outros investigadores consideraram que a aterogenicidade de uma proteína depende do seu conteúdo de lisina e que a caseína contém 40% mais lisina que a proteína de soja. OZBEN (1989), utilizando caseína modificada (conteúdo de lisina reduzido por meio de reação de Maillard), verificou que houve redução no efeito hipercolesterolemiantes da caseína, porém esta redução não foi superior à da proteína de soja. Tais relatos mostraram que existem outros componentes na proteína intacta que promovem a redução das concentrações de colesterol ou interação com a

proteína para afetar o metabolismo, favoravelmente (ANDERSON et al., 1999b).

Mais recentemente, as pesquisas têm mostrado que os componentes da proteína de soja responsáveis por grande parte de seu efeito cardioprotetor são moléculas extraídas com álcool, tais como saponinas, fitoesteróis e isoflavonas (SUGANO e KOBAYASHI, 1993; BALMIR et al., 1996; ANTHONY et al., 1997; TOVAR-PALACIO et al., 1998). Contudo, POTTER et al. (1993b) observaram que as saponinas não apresentam nenhum efeito hipocolesterolemizante na presença da proteína de soja. Em adição, o processamento diminui o teor de fitoesteróis a concentrações irrisórias (ANDERSON e WOLF, 1995). As isoflavonas, que são amplamente removidas da proteína de soja quando esta é lavada com álcool, como é o caso dos concentrados protéicos, têm sido bastante estudadas, pois alteram as concentrações de lipídios plasmáticos, tanto na presença quanto na ausência da proteína (ANDERSON et al., 1999b). Entretanto, o efeito cardioprotetor das isoflavonas parece estar associado à sua ligação a receptores estrógenos dentro das células, de maneira semelhante ao estradiol, logo conclui-se que estes compostos poderiam aumentar a atividade do receptor para LDL. Outro mecanismo potencial seria que as isoflavonas agiriam como antioxidantes, inibindo o processo trombótico e bloqueando a proliferação de células musculares lisas nas paredes das artérias (ANTHONY et al., 1997). Então, o teor de isoflavonas dos cultivares pode ter influenciado os seus efeitos hipocolesterolemizantes, visto que a linhagem UFV116 foi mais eficaz na redução do colesterol sanguíneo e apresentou teores de genisteína e daidzeína significativamente maiores que o da variedade OCEPAR-19.

Outro componente das farinhas associado ao seu efeito hipocolesterolemizante é a fibra alimentar. A fibra de soja tem sido associada com a redução de lipídios séricos em humanos. Entretanto, diversos estudos têm mostrado que a fibra de soja não afeta os lipídios séricos, quando administrada juntamente com a proteína (POTTER et al., 1993a; BAKHIT et al., 1994). Quando se utiliza farinha de soja integral, observam-se concentrações séricas de colesterol não tão baixas quando se utiliza o isolado protéico adicionado de fibra de cotilédono ou celulose. Então, parece que a fibra presente nas farinhas não foi fator crucial para seu efeito

hipocolesterolemizante. Além do mais, grande parte dela foi removida durante o processamento, em virtude da retirada da casca dos grãos de soja.

Pouco é conhecido sobre os efeitos do ácido fítico dietético no perfil de lipídios séricos em humanos. Em ratos, entretanto, JARIWALLA et al. (1990) relataram que a adição de 9 g/kg de ácido fítico às dietas experimentais, acrescidas ou não de colesterol dietético, promoveu redução no colesterol sérico e nos triglicerídeos. Em adição, a quelatação com o ferro no intestino diminui sua absorção, o que pode suprimir o dano oxidativo aos lipídios e às proteínas no sangue, reduzindo o risco de formação de lesões ateroscleróticas. Por outro lado, numerosos estudos têm mostrado que o consumo de dietas que contêm basicamente produtos de soja com alto teor de ácido fítico pode promover deficiência mineral, incluindo anemia (POTTER, 1995). As farinhas de soja utilizadas apresentaram teores de fitato de 1,33 mg/g para UFV116 e 1,03 mg/g para OCEPAR-19 (dados não-publicados). Sendo assim, a quantidade de farinha utilizada de cada variedade, neste estudo, forneceu 465,5 e 381,1 mg de fitato, para UFV e OCP, respectivamente. Então, é possível que os fitatos tenham contribuído, em parte, para o melhor efeito hipocolesterolemizante das proteínas de soja dos cultivares testados.

4.4. Abundância em mRNA para 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGR) e colesterol 7 α -hidroxilase (CYP7A)

Observou-se que os cultivares de soja promoveram redução significativa nos níveis de mRNA para HMGR, independente da adição de colesterol, em comparação com a CAS. Entretanto, não foi observada diferença significativa entre os cultivares de soja (Quadros 16 e 17).

Com relação à CYP7A, observou-se que houve aumento na produção de mRNA para CYP7A nos animais alimentados com os cultivares de soja. Entretanto, esse aumento foi significativo somente quando se comparou CAS e UFV+OCP, com e sem a adição de colesterol. Quando se comparou UFV e OCP, não foi observada diferença significativa, independente da adição de colesterol (Quadros 16 e 17).

Quadro 16 – Valores relativos médios e contrastes para níveis de mRNA para HMGR e CYP7A em ratos alimentados com dietas experimentais

Dietas	-----Valores relativos-----	
	HMGR	CYP7A
CAS	3,27	0,49
CAS(+)	2,48	0,82
UFV	1,92	1,37
UFV(+)	1,59	1,43
OCP	1,97	1,25
OCP(+)	1,71	1,45
Contrastes		
UFV x OCP	NS	NS
UFV(+) x OCP(+)	NS	NS
[UFV+OCP] x [UFV(+)+OCP(+)]	NS	NS
CAS x [UFV+OCP]	*	*
CAS(+) x [UFV(+)+OCP(+)]	*	*

HMGR = 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase; CYP7A = colesterol 7 α -hidroxilase; valores relativos são expressos em unidades de mRNA para HMGR ou CYP7A por unidade de RNA ribossômico; * significativo pelo teste F, por contraste, em nível de 5% de probabilidade; NS = não-significativo; CAS = dieta à base de caseína; CAS(+) = dieta à base de caseína + 0,25% de colesterol; UFV = dieta à base do cultivar UFV116; UFV(+) = dieta à base do cultivar UFV116 + 0,25% colesterol; OCP = dieta à base do cultivar OCEPAR-19; e OCP(+) = dieta à base do cultivar OCEPAR-19 + 0,25% colesterol.

Quadro 17 – Grau de liberdade (GL) e quadrados médios dos contrastes para abundância em mRNA para HMGR e CYP7A em ratos alimentados com dietas experimentais

Fontes de Variação	GL	-----Quadrados Médios-----	
		HMGR	CYP7A
Dietas	2	4,6508*	2,0567*
Col	1	1,9179*	0,3393*
Dietas*Col	2	0,2549	0,0553
Contrastes			
UFV x OCP	1	0,0074	0,0421
UFV(+) x OCP(+)	1	0,0413	0,0018
[UFV+OCP] x [UFV(+)+OCP(+)]	1	0,5203	0,0976
CAS x [UFV+OCP]	1	7,0394*	2,6624*
CAS(+) x [UFV(+)+OCP(+)]	1	2,7233*	1,5177*
Resíduo	30	0,2798	0,0903

HMGR = 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase; CYP7A = colesterol 7 α -hidroxilase; valores relativos são expressos em unidades de mRNA para HMGR ou CYP7A por unidade de RNA ribossômico; * significativo pelo teste F, por contraste, em nível de 5% de probabilidade; NS = não-significativo; CAS = dieta à base de caseína; CAS(+) = dieta à base de caseína + 0,25% de colesterol; UFV = dieta à base do cultivar UFV116; UFV(+) = dieta à base do cultivar UFV116 + 0,25% colesterol; OCP = dieta à base do cultivar OCEPAR-19; e OCP(+) = dieta à base do cultivar OCEPAR-19 + 0,25% colesterol.

A HMGR é a enzima limitante na síntese endógena de colesterol, e tanto seus níveis quanto sua atividade são bastante influenciados pelo suprimento de colesterol. MADANI et al. (1998) relataram que a proteína de soja aumenta a atividade da HMGR, mas a adição de colesterol à dieta reduz sua atividade. Entretanto, os dois cultivares de soja promoveram redução nos níveis de mRNA para HMGR de maneira similar, e a adição de colesterol às dietas não teve influência. É importante considerar que neste estudo todas as dietas utilizadas foram hiperlipídicas e que os cultivares de soja foram utilizados na forma de farinha integral. A maioria dos estudos que investigam os efeitos da proteína de soja na regulação da biossíntese de colesterol utiliza isolado protéico e dietas baixas em gordura e, ou, sem colesterol (HUFF et al., 1977; HUFF e CARROLL, 1980; NAGATA et al., 1980, 1981; SUGANO et al., 1982; TASKER e POTTER, 1993). Então, as dietas hiperlipídicas e os componentes não-protéicos presentes nas farinhas, biologicamente ativos, podem ter exercido influência direta e, ou, indireta nos efeitos da proteína, promovendo redução nos níveis de mRNA para HMGR, o que possivelmente contribuiu para a manutenção dos níveis sanguíneos de colesterol baixos nos animais alimentados com as dietas de soja.

A auto-radiografia das bandas hibridizadas com cDNA para HMGR marcado com ^{32}P está apresentada na Figura 3.

Na literatura encontram-se, freqüentemente, trabalhos que avaliam alterações na atividade de CYP7A em função do consumo de soja e de seus produtos. Neste estudo, foi avaliada a produção de mRNA para esta enzima, visto que, se há alterações na sua síntese, presume-se que seu *turnover* e, ou, sua atividade estão alterados. Na maioria das vezes, um maior nível de mRNA é acompanhado por um aumento na atividade dessa enzima. KRITCHEVSKY et al. (1984) relataram que o consumo de proteína de soja não influenciou a atividade de CYP7A em ratos. Já SIRTORI et al. (1984) relataram redução na atividade dessa enzima. Efeitos similares foram observados por HUFF et al. (1977), NAGATA et al. (1981) e SUGANO et al. (1982). Entretanto, estes autores alimentaram diferentes espécies de animais com dietas normolipídicas e baixas ou livres de colesterol, além de utilizarem o isolado protéico de soja como fonte de proteína nas dietas.

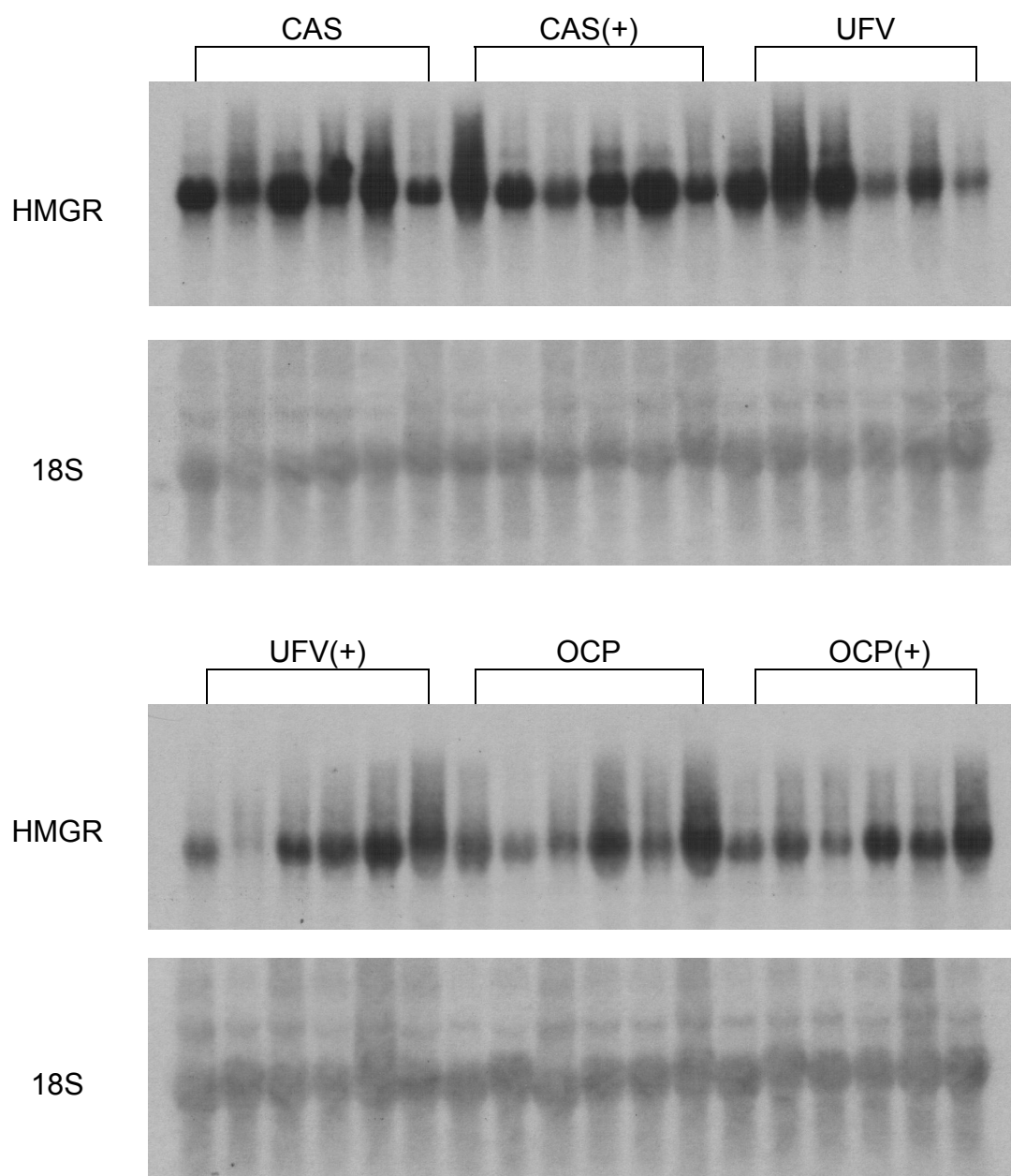


Figura 3 – Análise de *Northern blot* dos níveis de mRNA para HMGR em ratos alimentados com dietas experimentais por 28 dias. RNA total foi isolado de amostras de fígado e 20 µg/canaleta foram submetidos a eletroforese, *blotting* e hibridização com sondas específicas de cDNA para HMGR. A abundância em mRNA para HMGR foi expressa em relação à abundância para rRNA 18S.

No presente estudo, as dietas foram hiperlipídicas e cada uma delas foi administrada com e sem a adição de colesterol dietético, além de ter sido utilizada farinha integral de soja. HORTON et al. (1995) observaram que tanto a atividade de CYP7A quanto os níveis de mRNA estão aumentados em ratos alimentados com colesterol e dietas hiperlipídicas. SHEFER et al. (1992) observaram que os níveis de mRNA para CYP7A aumentaram em 50% após alimentação com colesterol. MADANI et al. (1998) observaram que a suplementação de colesterol (0,1%) aumentou a atividade de CYP7A em ratos alimentados com proteína de soja. Neste estudo, os cultivares de soja promoveram aumento nos níveis de mRNA para CYP7A, independente da adição de colesterol, ou seja, um aumento na síntese desta enzima. Entretanto, quaisquer que tenham sido as diferenças de composição química entre os cultivares de soja utilizados, elas não foram suficientes para que diferenças nos níveis de mRNA para CYP7A fossem observadas entre eles. Por outro lado, a presença desses mesmos componentes pode ter influenciado o aumento da produção desta enzima, independente da adição de colesterol às dietas.

A auto-radiografia das bandas hibridizadas com cDNA para CYP7A marcado com ^{32}P está apresentada na Figura 4.

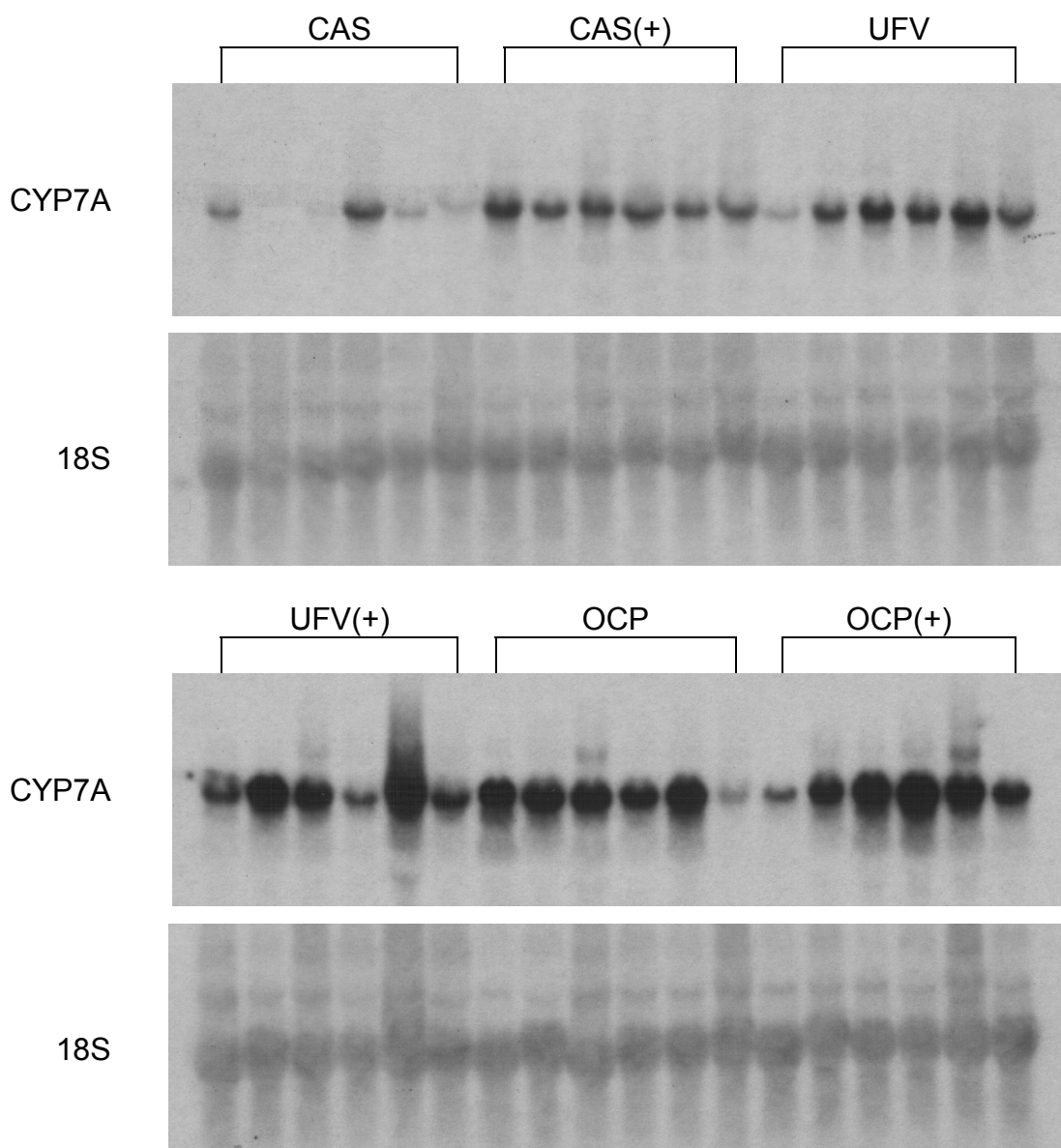


Figura 4 – Análise de *Northern blot* dos níveis de mRNA para CYP7A em ratos alimentados com dietas experimentais por 28 dias. RNA total foi isolado de amostras de fígado e 20 µg/canaleta foram submetidos a eletroforese, *blotting* e hibridização com sondas específicas de cDNA para HMGR. A abundância em mRNA para CYP7A foi expressa em relação à abundância para rRNA 18S.

4.5. Excreção fecal de ácidos biliares e esteróides neutros

4.5.1. Ácidos biliares

No presente estudo observou-se aumento na excreção de ácidos biliares totais, em razão do consumo das dietas de soja. Entretanto, este aumento somente foi significativo quando se comparou UFV e OCP, conjuntamente, em função da adição de colesterol dietético. Observou-se também que não houve diferença significativa entre CAS e UFV+OCP, independente da adição de colesterol às dietas, e nem tão pouco entre UFV e OCP. Desta maneira, os cultivares de soja promoveram maior excreção de ácidos biliares totais de maneira similar, mas somente quando o colesterol foi adicionado às dietas (Quadros 18 e 19).

Com relação aos ácidos biliares primários totais, a adição de colesterol às dietas mostrou uma tendência de redução na formação destes nas fezes. Entretanto, não houve diferença significativa entre as dietas testadas. Somente houve diferença significativa entre CAS e UFV+OCP, conjuntamente, quando o colesterol não foi adicionado às dietas. Os cultivares de soja promoveram maior excreção de ácidos biliares primários totais, de maneira similar (Quadros 18 e 19).

Considerando a excreção de ácidos biliares secundários totais nas fezes dos animais, observou-se maior excreção destes compostos nas dietas de soja. Entretanto, esta diferença foi significativa somente quando os dois cultivares de soja foram comparados conjuntamente, em função da adição de colesterol dietético (Quadros 18 e 19). Entretanto, em valores absolutos, a adição de colesterol às dietas experimentais promoveu um aumento expressivo na excreção destes compostos, o que correspondeu, em termos percentuais, a 435,26% para CAS, 253,49% para UFV e 166,93% para OCP, o mesmo se refletindo na excreção total 442,79% para CAS, 218,96% para UFV e 151,85% para OCP (Figura 5).

Quadro 18 – Valores médios e contrastes para excreção fecal de ácidos biliares primários (ABP), secundários (ABS) e totais (ABT) de ratos alimentados com dietas experimentais por 28 dias

Dietas	ABP	ABS	ABT
	-----mg/g de fezes secas-----		
CAS	0,19	1,73	1,92
CAS(+)	1,01	7,53	8,54
UFV	1,08	3,72	4,80
UFV(+)	1,08	9,43	10,51
OCP	1,42	6,41	7,83
OCP(+)	1,19	10,70	11,89
Contrastes			
UFV x OCP	NS	NS	NS
UFV(+) x OCP(+)	NS	NS	NS
[UFV+OCP] x [UFV(+)+OCP(+)]	NS	*	*
CAS x [UFV+OCP]	*	NS	NS
CAS(+) x [UFV(+)+OCP(+)]	NS	NS	NS

* Significativo pelo teste F, por contraste, em nível de 5% de probabilidade; NS = não-significativo; CAS = dieta à base de caseína; CAS(+) = dieta à base de caseína + 0,25% de colesterol; UFV = dieta à base do cultivar UFV116; UFV(+) = dieta à base do cultivar UFV116 + 0,25% colesterol; OCP = dieta à base do cultivar OCEPAR-19; e OCP(+) = dieta à base do cultivar OCEPAR-19 + 0,25% colesterol.

Quadro 19 – Grau de liberdade (GL) e quadrados médios dos contrastes para excreção fecal de ácidos biliares primários (ABP), secundários (ABS) e totais (ABT) de ratos alimentados com dietas experimentais por 28 dias

Fontes de Variação	GL	-----Quadrados Médios-----		
		ABP	ABS	ABT
Dietas	2	1,54	46,03	64,03
Col	1	0,34	249,80*	268,51*
Dietas*Col	2	0,90	2,16	5,02
Contrastes				
UFV x OCP	1	0,34	21,69	27,44
UFV(+)-OCP(+)	1	0,04	4,79	5,68
[UFV+OCP]-[UFV(+)-OCP(+)]	1	0,08	150,15*	143,26*
CAS-[UFV-OCP]	1	4,44*	44,29	76,80
CAS(+)-[UFV(+)-OCP(+)]	1	0,06	25,61	28,19
Resíduo	30	0,70	25,29	32,90

* Significativo pelo teste F, por contraste, em nível de 5% de probabilidade; NS = não-significativo; CAS = dieta à base de caseína; CAS(+) = dieta à base de caseína + 0,25% de colesterol; UFV = dieta à base do cultivar UFV116; UFV(+) = dieta à base do cultivar UFV116 + 0,25% colesterol; OCP = dieta à base do cultivar OCEPAR-19; e OCP(+) = dieta à base do cultivar OCEPAR-19 + 0,25% colesterol.

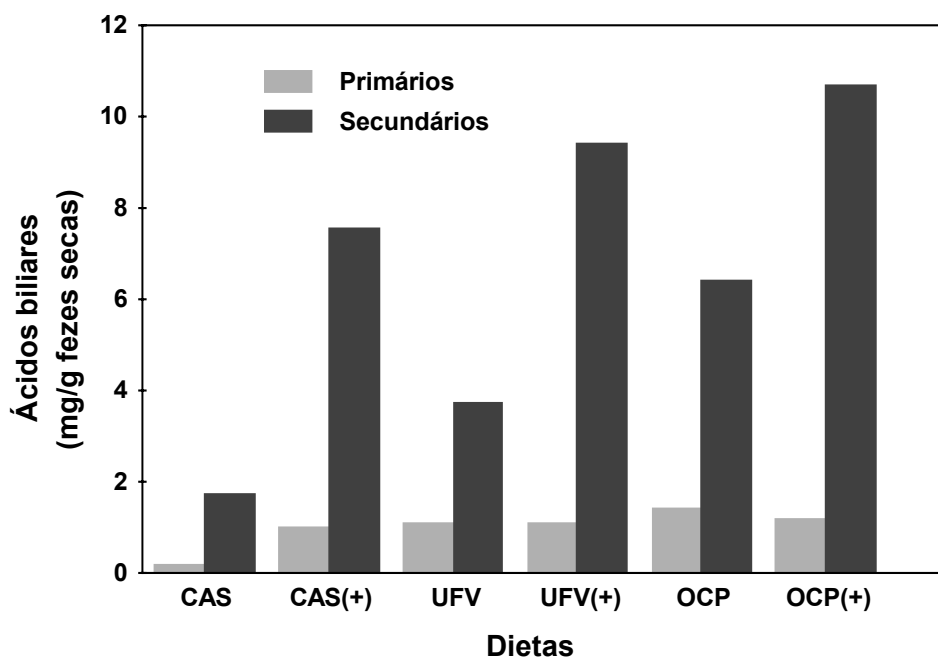


Figura 5 – Excreção fecal de ácidos biliares primários e secundários de animais alimentados com proteína de dois cultivares de soja e caseína, com e sem a adição de colesterol.

Observando os ácidos biliares primários cólico, quenodesoxicólico, α -muricólico e β -muricólico, verificou-se que a adição de colesterol às dietas de soja promoveu menor excreção somente do ácido cólico, mas esta diferença só foi significativa quando as dietas de soja foram comparadas conjuntamente. Ao contrário, o ácido α -muricólico foi mais excretado sob o efeito das dietas de soja, enquanto o ácido β -muricólico foi menos excretado em comparação à caseína, porém somente quando o colesterol foi adicionado. O ácido quenodesoxicólico foi mais excretado na dieta UFV do que na OCP, sem adição de colesterol. Não houve diferença significativa na excreção dos ácidos primários, nas demais comparações testadas (Quadros 20 e 21).

Com relação aos ácidos biliares secundários litocólico, desoxicólico, hyodesoxicólico e ursodesoxicólico, observou-se aumento na sua excreção nas dietas adicionadas de colesterol. Entretanto, esse aumento somente foi significativo para o ácido litocólico, quando as dietas de soja foram comparadas conjuntamente, com e sem a adição de colesterol dietético. Para o ácido

desoxicólico, houve aumento significativo na excreção nas dietas de soja, em comparação à caseína sem adição de colesterol (Quadros 20 e 21). Contudo, em valores absolutos, a adição de colesterol às dietas experimentais promoveu um aumento expressivo na excreção desses compostos, principalmente de ácido litocólico (Figura 6). COSTA (1992) observou que ratos alimentados com 1% de colesterol excretaram mais ácidos litocólico, hyodesoxicólico e ácidos biliares totais do que ratos alimentados com 0,2% de colesterol + 0,1% de ácido cólico. Apesar de a suplementação com colesterol no presente estudo ter sido de 0,25%, não houve suplementação com ácido cólico, sem contar o fato de as dietas terem sido hiperlipídicas. Então, provavelmente houve aumento na conversão do colesterol em ácidos biliares primários e um subsequente aumento na conversão destes em secundários, especialmente litocólico.

Estudos realizados, particularmente em ratos e coelhos, têm evidenciado que a proteína de soja aumenta a excreção fecal de ácidos biliares, quando comparada à caseína. Em consequência, muitas vezes a biossíntese de colesterol e a atividade do receptor para LDL aumentam para fornecer colesterol para a síntese de ácidos biliares. O principal resultado deste efeito em rede é o aumento da remoção do colesterol do sangue, via LDL receptor, reduzindo as concentrações de colesterol sérico, particularmente a fração LDL (POTTER, 1995).

IWAMI et al. (1986) relataram que o isolado protéico de soja foi inferior à caseína em termos de digestibilidade e sugeriram que os peptídeos hidrofóbicos da proteína de soja que permanecem depois da digestão se ligam aos ácidos biliares, sendo os responsáveis pelo efeito hipocolesterolemizante da proteína. Por outro lado, Saeki e Kiryama (1990), citados por MADANI et al. (1998), relataram que as diferenças na composição aminoacídica entre proteína de soja e caseína são as principais responsáveis pela redução do colesterol sérico via conversão em ácidos biliares. Entretanto, NAGATA et al. (1982) relataram que nenhuma diferença significativa foi observada na absorção do colesterol e na excreção entre ratos alimentados com misturas de aminoácidos equivalentes a ambas as proteínas.

Quadro 20 – Valores médios e contrastes para ácidos biliares fecais de ratos alimentados com dietas experimentais por 28 dias

Dietas	-----Ácidos Biliares (mg/g de fezes secas)-----							
	Primários				Secundários			
	C	CDC	AMUR	BMUR	LC	DC	HDC	UDC
CAS	0,08	0,02	0,01	0,00	0,83	0,54	0,36	0,09
CAS(+)	0,02	0,14	0,09	0,39	5,46	0,95	1,12	0,37
UFV	0,37	0,07	0,14	0,19	1,16	1,49	1,07	0,31
UFV(+)	0,02	0,21	0,23	0,05	5,41	1,99	2,03	0,56
OCP	0,38	0,14	0,24	0,05	2,24	2,24	1,92	0,60
OCP(+)	0,07	0,12	0,22	0,15	6,42	2,05	2,23	0,62
Contrastes								
UFV x OCP	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
UFV(+) x OCP(+)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
[UFV+OCP] x [UFV(+)+OCP(+)]	**	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS
CAS x [UFV+OCP]	NS	NS	*	NS	NS	**	NS	NS
CAS(+) x [UFV(+)+OCP(+)]	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS

C = cólico; CDC = quenodesoxicólico; DC = desoxicólico; LC = litocólico; AMUR = alfa-muricólico; HDC = hyodesoxicólico; UDC = ursodesoxicólico; BMC = beta-muricólico; CAS = dieta à base de caseína; CAS(+) = dieta à base de caseína + 0,25% de colesterol; UFV = dieta à base do cultivar UFV116; UFV(+) = dieta à base do cultivar UFV116 + 0,25% colesterol; OCP = dieta à base do cultivar OCEPAR-19; OCP(+) = dieta à base do cultivar OCEPAR-19 + 0,25% colesterol; * significativo pelo teste F, por contraste, em nível de 5% de probabilidade; ** significativo pelo teste F, por contraste, em nível de 10% de probabilidade; e NS = não-significativo.

Quadro 21 – Grau de liberdade (GL) e quadrados médios dos contrastes para excreção fecal de ácidos biliares primários e secundários (ABS) em ratos alimentados com dietas experimentais por 28 dias

Dietas	-----Ácidos Biliares (mg/g de fezes secas)-----							
	Primários				Secundários			
	C	CDC	AMUR	BMUR	LC	DC	HDC	UDC
Dietas	0,105	0,013	0,112*	0,031	5,019*	6,192*	5,455*	0,444
Col	0,515	0,056	0,024	0,134	170,625	0,503	4,136	0,295
Dietas*Col	0,076	0,024	0,013	0,209*	0,176	0,428	0,329	0,060
Contrastes								
UFV x OCP	0,001	0,137*	0,033	0,057	3,547	1,705	2,156	0,251
UFV(+) x OCP(+)	0,008	0,026	0,000	0,031	3,019	0,010	0,123	0,011
[UFV+OCP] x [UFV(+)+OCP(+)]	0,654**	0,022	0,007	0,001	106,659*	0,137	2,420	0,105
CAS x [UFV+OCP]	0,352	0,028	0,140*	0,055	3,005	6,981**	5,197	0,546
CAS(+) x [UFV(+)+OCP(+)]	0,002	0,003	0,077	0,337*	0,821	4,543	4,091	0,200
Resíduo	0,162	0,022	0,027	0,040	6,475	1,816	1,861	0,251

C = cólico; CDC = quenodesoxicólico; DC = desoxicólico; LC = litocólico; AMUR = alfa-muricólico; HDC = hyodesoxicólico; UDC = ursodesoxicólico; BMC = beta-muricólico; CAS = dieta à base de caseína; CAS(+) = dieta à base de caseína + 0,25% de colesterol; UFV = dieta à base do cultivar UFV116; UFV(+) = dieta à base do cultivar UFV116 + 0,25% colesterol; OCP = dieta à base do cultivar OCEPAR-19; OCP(+) = dieta à base do cultivar OCEPAR-19 + 0,25% colesterol; * significativo pelo teste F, por contraste, em nível de 5% de probabilidade; ** significativo pelo teste F, por contraste, em nível de 10% de probabilidade; e NS = não-significativo.

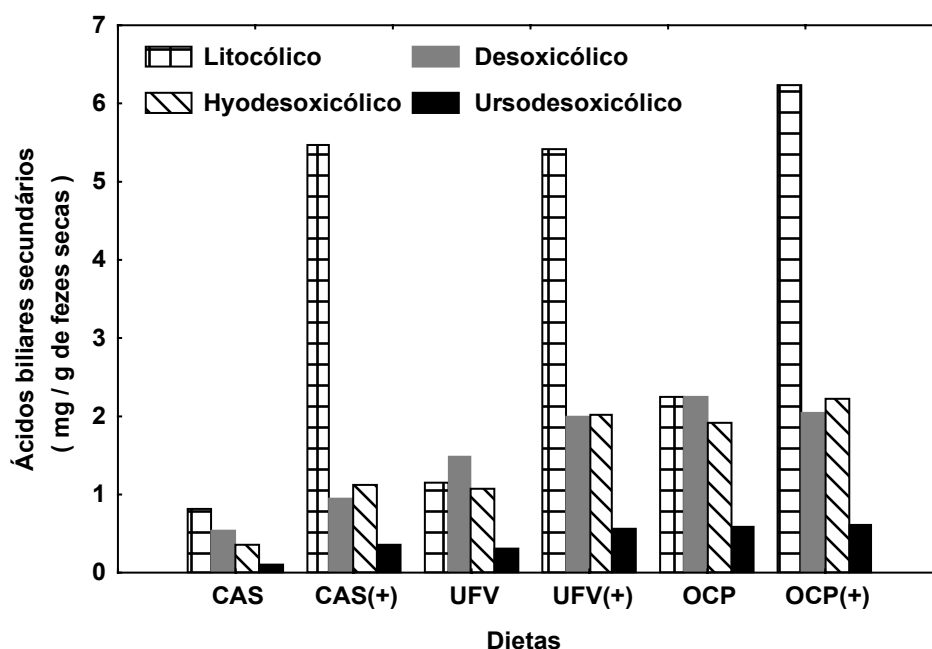


Figura 6 – Excreção fecal de ácidos biliares secundários de animais alimentados com proteína de dois cultivares de soja e caseína, com e sem a adição de colesterol.

Segundo MADANI et al. (1998), o efeito hipocolesterolemizante da proteína vegetal, particularmente da proteína de soja, é atribuído a uma maior excreção fecal de esteróides, em consequência de uma absorção intestinal de colesterol reduzida. POTTER (1995) sugere que existe uma interrupção na absorção intestinal de ácidos biliares e colesterol dietético quando a proteína de soja é consumida. Tal fato tem sido demonstrado em animais, mas nem sempre em humanos. Outros fatores poderiam estar envolvidos neste processo. Componentes não-protéicos, como fibras, ácido fítico, minerais e isoflavonas, associados com a proteína de soja, poderiam também afetar o metabolismo do colesterol.

Entretanto, considerando os resultados anteriores obtidos neste estudo, relacionados aos níveis de colesterol sérico e hepático e aos níveis de HMGR e CYP7A, pode-se sugerir que os dois cultivares de soja promoveram redução nos níveis de colesterol sanguíneo provavelmente pela redução da sua síntese endógena e maior conversão em ácidos biliares. Ainda, apesar de a dieta UFV sem adição de colesterol não ter mostrado diferença estatística da

OCP com relação à abundância em mRNA para as enzimas estudadas, ela foi mais eficaz na redução do colesterol sanguíneo. Então, o cultivar UFV116 pode ter expressado este efeito diferenciado em virtude de outros mecanismos que não os estudados.

4.5.2. Esteróides neutros totais

Observou-se que não houve diferença estatística na excreção de esteróides neutros totais entre as dietas experimentais, quando estas não foram adicionadas de colesterol. Quando se comparou UFV e OCP, adicionadas de colesterol, verificou-se que a dieta OCP promoveu maior excreção destes compostos. As dietas UFV+OCP, quando comparadas com e sem a adição de colesterol, promoveram maior excreção de esteróides neutros somente quando o colesterol foi adicionado. As dietas de CAS promoveram maior excreção de esteróides neutros em relação às demais, quando foram adicionadas de colesterol (Quadros 22 e 23).

Quadro 22 – Valores médios e contrastes para excreção fecal de esteróides neutros totais (ENT) em ratos alimentados com dietas experimentais

Dietas	ENT (mg/g fezes secas)
CAS	20,99
CAS(+)	72,55
UFV	9,70
UFV(+)	17,25
OCP	14,09
OCP(+)	36,31
Contrastes	
UFV x OCP	NS
UFV(+) x OCP(+)	*
[UFV+OCP] x [UFV(+)+OCP(+)]	*
CAS x [UFV+OCP]	NS
CAS(+) x [UFV(+)+OCP(+)]	*

* Significativo pelo teste F, por contraste, em nível de 5% de probabilidade; NS = não-significativo; CAS = dieta à base de caseína; CAS(+) = dieta à base de caseína + 0,25% de colesterol; UFV = dieta à base do cultivar UFV116; UFV(+) = dieta à base do cultivar UFV116 + 0,25% colesterol; OCP = dieta à base do cultivar OCEPAR-19; e OCP(+) = dieta à base do cultivar OCEPAR-19 + 0,25% colesterol.

Quadro 23 – Grau de liberdade (GL) e quadrado médio dos contrastes para excreção fecal de esteróides neutros totais em ratos alimentados com dietas experimentais

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio
Dietas	2	3.422,68
Col	1	6.613,30
Dietas*Col	2	1.506,36
Contrastes		
UFV-OCP	1	57,75
UFV(+)-OCP(+)	1	1.088,97*
[UFV+OCP]-[UFV(+)-OCP(+)]	1	1.328,90*
CAS-[UFV-OCP]	1	331,02
CAS(+)-[UFV(+)-OCP(+)]	1	8.380,34*
Resíduo	30	170,24

* Significativo pelo teste F, por contraste, em nível de 5% de probabilidade; NS = não-significativo; CAS = dieta à base de caseína; CAS(+) = dieta à base de caseína + 0,25% de colesterol; UFV = dieta à base do cultivar UFV116; UFV(+) = dieta à base do cultivar UFV116 + 0,25% colesterol; OCP = dieta à base do cultivar OCEPAR-19; e OCP(+) = dieta à base do cultivar OCEPAR-19 + 0,25% colesterol.

Sendo assim, todas as dietas experimentais promoveram aumento na excreção de esteróides neutros totais, quando adicionadas de colesterol dietético, devendo-se ressaltar que a maior excreção ocorreu na dieta de caseína e, entre as dietas de soja, a OCP promoveu maior excreção do que UFV.

KIM et al. (1980) verificaram aumento na excreção de esteróides em suínos alimentados com dietas hiperlipídicas, adicionadas de colesterol e proteína de soja. HUFF e CARROLL (1980) encontraram resultados similares em coelhos. TANAKA et al. (1984) e VAN DER MEER e BEYNEN (1987) também observaram maior excreção de ácidos biliares e esteróides neutros em ratos alimentados com proteína de soja. BEYNEN (1990) verificou um aumento significativo na excreção de esteróides neutros em animais experimentais alimentados com proteína de soja. Estes resultados têm sido observados primariamente em ratos e coelhos (HUFF e CARROLL, 1980; NAGATA et al., 1982; VAN DER MEER et al., 1988), já relatos em outras espécies, incluindo humanos, são menos consistentes (KIM et al., 1978; FUMAGALLI et al., 1982; JASKIEWICZ et al., 1987; DUANE, 1999). Nestes estudos, a proteína de soja foi utilizada como isolado protéico, excluindo, desta maneira, possíveis interferências de componentes não-protéicos. No presente estudo, os cultivares

de soja foram introduzidos na dieta como farinha integral e às expensas de caseína. Então, componentes não-protéicos dessas preparações podem ter influenciado no efeito destes cultivares na excreção fecal de tais compostos. Outro ponto a ser considerado são as diferenças entre os modelos animais utilizados, pois o tempo de exposição, as variações na composição das dietas, o sexo e a idade dos animais, a raça, entre outros, são fatores que podem influenciar os efeitos estudados.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O objetivo deste estudo foi determinar os efeitos de um novo cultivar de soja (UFV116), geneticamente modificado para ausência das lipoxigenases 2 e 3, na regulação do metabolismo do colesterol em ratos, mais especificamente na síntese de enzimas regulatórias deste processo e na excreção de esteróides fecais. Foram utilizadas a variedade OCEPAR-19 (comercial) e uma proteína animal (caseína), para efeitos comparativos.

Inicialmente, foram determinados os teores de proteínas e lipídios totais e a composição em aminoácidos, ácidos graxos e isoflavonas, em ambos os cultivares. Não houve diferença significativa entre eles, com relação ao teor de proteína. O cultivar UFV116 apresentou maior teor de fenilalanina, treonina, tirosina, glicina, ácidos aspártico e glutâmico. O teor de lipídios totais foi menor para UFV116 que no entanto apresentou maiores teores de ácidos palmítico e linoléico e menores para esteárico, linolênico e oléico. Este cultivar apresentou maior teor de isoflavonas nas formas agliconas.

Numa segunda etapa, grupos de ratos machos foram alimentados com dietas semipurificadas (AIN93M) contendo proteínas oriundas de dois cultivares de soja, UFV116 (UFV) e OCEPAR-19 (OCP), ou caseína (CAS), com e sem a adição de colesterol dietético (0,25%), por 28 dias. Níveis séricos e hepáticos de colesterol foram determinados, assim como a abundância em mRNA para HMGR e CYP7A. A excreção fecal de esteróides ácidos e neutros também foi avaliada.

Não houve diferença entre as dietas de soja testadas com relação ao ganho de peso dos animais, devendo-se ressaltar que a adição de colesterol dietético não influenciou, apesar do maior consumo alimentar, os grupos alimentados com UFV, com e sem a adição de colesterol. A linhagem UFV apresentou um coeficiente de eficiência alimentar maior, que o da variedade OCP, com e sem a adição de colesterol.

A linhagem UFV foi mais eficaz na redução do colesterol sérico na dieta sem adição de colesterol, em comparação à variedade OCP. Contudo, não teve influência no acúmulo de colesterol no fígado, com e sem a adição de colesterol dietético. Ambos os cultivares reduziram o colesterol do sangue e seu acúmulo no fígado, em comparação à caseína, independente da adição de colesterol na dieta.

Houve redução dos níveis de mRNA para 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase nas dietas de soja, quando comparadas com caseína, independente da adição de colesterol dietético. As dietas de soja promoveram um aumento nos níveis de mRNA para colesterol 7 α -hidroxilase, com e sem a adição de colesterol dietético em comparação à caseína. Tal fato foi acompanhado por maior excreção de ácidos biliares fecais, especificamente, ácidos biliares secundários. Não houve diferença significativa entre as variedades de soja nos parâmetros avaliados. A adição de colesterol às dietas experimentais provocou aumento da excreção de esteróides neutros.

Estes resultados evidenciam que as proteínas de soja testadas promoveram redução nas concentrações séricas de colesterol, de maneira similar. O excesso de colesterol depositado no fígado, provavelmente, foi convertido em esteróides e excretado nas fezes, primariamente como ácidos biliares. Adicionalmente, a síntese hepática de colesterol também foi reduzida, contribuindo para a manutenção dos baixos níveis séricos.

É importante considerar que componentes não-protéicos dos cultivares podem ter influenciado os seus efeitos hipocolesterolemiantes.

Sendo assim, a linhagem UFV116 apresentou propriedades benéficas no controle do metabolismo do colesterol, de maneira semelhante a uma variedade comumente utilizada pela indústria brasileira (OCEPAR-19). Entretanto, o fato de a nova linhagem não possuir as lipoxigenases 2 e 3 pode favorecer seu consumo, pois a ausência destas enzimas reduz a oxidação dos

lipídios e, com isto, a formação de ácidos, aldeídos e cetonas de cadeia carbônica curta, os quais têm sido implicados como a principal causa dos sabores e aromas indesejáveis, associados aos produtos de soja.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONZO, N., HIRS, C.H.W. Automation of sample application in amino acid analyzer. **Analytical Biochemistry**, v.23, n.2, p.272-288, 1968.
- ANDERSON, J.A., JOHNSTONE, B.M., COOK-NEWELL, M.E. Meta-analysis of the effect of soy protein intake on serum lipids. **The New England Journal of Medicine**, v.333, n.5, p.276-282, 1995.
- ANDERSON, J.J.B., GARNER, S.C. Phytoestrogens and human function. **Nutrition Today**, v.32, n.6, p.232-239, 1997.
- ANDERSON, J.J.B., ANTHONY, M.A., MESSINA, M., GARNER, S.C. Effects of phyto-oestrogens on tissues. **Nutrition Research Reviews**, v.12, p.75-116, 1999a.
- ANDERSON, J.W., SMITH, B.M., WASHNOCK, C.S. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, n.3, p.464S-474S, 1999b.
- ANDERSON, J.W. Dietary fiber, lipids and atherosclerosis. **American Journal of Cardiology**, v.60, n.12, p.17-22, 1987.
- ANDERSON, R.L., WOLF, W.J. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. **The Journal of Nutrition**, v.125, n.3, p.581S-588S, 1995.
- ANTHONY, M.S., CLARKSON, T.B., BULLOCK, B.C., WAGNER, J.D. Soy protein versus soy phytoestrogens in the prevention of diet-induced coronary artery atherosclerosis of male cynomolgus monkeys. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.17, n.11, p.2524-2531, 1997.

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 12.ed. Washington: 1984. 1141p.
- AXELROD, B., CHEESBROUGH, T.M. LAAKSO, S. Lipoxygenase from soybeans. **Methods in Enzimology**, v.71, p.441-451, 1981.
- BAKHIT, R.M., KLEIN, B.P., ESSEX-SORLIE, D. Intake of 25 g of soybean protein with or without soybean fiber alters plasma lipids in men with elevated cholesterol concentrations. **The Journal of Nutrition**, v.124, n.2, p.213-222, 1994.
- BALMIR, F., STAACK, R., JEFFREY, E., JIMENEZ, M.D.B., WANG, L., POTTER, S. An extract of soy flour influences serum cholesterol and thyroid hormones in rats and hamsters. **The Journal of Nutrition**, v.126, n.12, p.3046-3053, 1996.
- BARROS, E.G., MOREIRA, M.A., FONTES, E.P.B. Atividades de lipoxigenases L₁ e L₃ em cultivares comerciais de soja. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.27, p.381-385, 1984.
- BEYNEN, A.C. Comparison of the mechanism proposed to explain the hypocholesterolemic effect of soybean protein versus casein in experimental animals. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.36, n.2, p.87S-93S, 1990.
- BONATO, E.R., BONATO, A.L. **A soja no Brasil: história e estatística**. Londrina: EMBRAPA, 1987. 61p.
- BUHMAN, K.K., FURUMOTO, E.J., DONKIN, S.S., STORY, J.A. Dietary psyllium increases fecal bile acid excretion, total steroid excretion and bile acid biosynthesis in rats. **The Journal of Nutrition**, v.128, n.7, p.1199-1203, 1998.
- CARROLL, K.K. Review of clinical studies on cholesterol-lowering response to soy protein. **Journal of American Dietetic Association**, v.91, n.7, p.820-827, 1991.
- CARROLL, K.K., KUROWSKA, E.M. Soy consumption and cholesterol reduction: Review of animal and human studies. **The Journal of Nutrition**, v.125, n.3, p.594S-597S, 1995.
- CHERYAN, M. Phytic acid interactions in food systems. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.13, n.4, p.297-335, 1980.
- CHEZEM, J.C., STORY, J.A. Development of an updated method for fecal bile acid and neutral steroid analysis. **American Clinical Laboratory**, v.16, n.5, p.20-21, 1997.

- CHO, B., EGWIM, P., FAHEY, G. Plasma lipid and lipoprotein cholesterol levels in swine: modification of protein-induced response by added cholesterol and soy fiber. **Atherosclerosis**, v.56, n.1, p.39-49, 1985.
- CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v.162, n.1, p.156-159, 1987.
- CHRISTOPHER, J.R., PISTORIUS, E.K., AXELROD, B. Isolation of a third isoenzyme of soybean lipoxygenase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.284, p. 54-62, 1972.
- CHRISTOPHER, J.R., PISTORIUS, E.K., AXELROD, B. Isolation of isozyme of soybean lipoxygenase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.198, p.12-19, 1970.
- COSTA, N.M.B. **Investigations into the cholesterol-lowering property of baked beans**. Reading, England: University of Reading, 1992. 200p. Thesis (Doctor of Philosophy) – University of Reading, 1992.
- DIEL E., STAN, H.J. Purification and characterization of two isozymes of lipoxygenase from soybeans. **Planta**, v.142, p.321-328, 1978.
- DUANE, W.C. Effects of soybean protein and very low dietary cholesterol on serum lipids, biliary lipids, and fecal sterols in humans. **Metabolism**. v.48, n.4, p.489-494, 1999.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Cinco mil anos de história**. [05/04/2000]. (<http://www.cnpso.embrapa.br/cinco.htm>).
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO / WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **General conclusions and recommendations of the consultation**. Expert consultation on fats and oils in human nutrition. Rome: FAO, 1998. p.3-9.
- FERNANDO, S.M., MURPHY, P.A. HPLC determination of thiamin and riboflavin in soybeans and tofu. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.163-167, 1993
- FUMAGALLI, R., SOLERI, L., FARINI, R., MUSSANTI, R., MANTERO, O., NOSEDA, G., GATI, E., SIRTORI, C.R. Fecal cholesterol excretion studies in type II hypercholesterolemic patients treated with soybean protein diet. **Atherosclerosis**, v.43, n.2, p.341-353, 1982.

- GARCÍA, M.C., TORRE, M., MARINA, M.L., LABORDA, F. Composition and characterization of soybean and related products. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.37, n.4, p.361-391, 1997.
- GARDNER, H.W. Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.27, p.220, 1979.
- GARRETT, R.H., GRISHAM, C.M. **Biochemistry**. 2. ed. Orlando, FL: Saunders College, 1999. 1127p.
- GOMES, J.C., COELHO, D.T. **Leite de soja na alimentação humana**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, 1989. 35p. (Boletim de extensão).
- GRAF, E. Applications of phytic acid. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.60, n.11, p.1861-1867, 1983.
- GRANT, G. Anti-nutritional effects of soybean: a review. **Progress in Food and Nutrition Science**, v.13, n.3, p.317-348, 1989.
- GRUNDY, S.M. Absorption and metabolism of dietary cholesterol. **Annual Review of Nutrition**, v.3, p.71-96, 1983.
- GRUNDY, S.M., AHRENS JUNIOR, E.R. Measurements of cholesterol turnover synthesis and absorption in man carried out by isotope kinetic and sterol balance methods. **Journal of Lipid Research**, v.10, n.1, p.91-107, 1969.
- HALPIN, B., PRESSEY, R., JEN, J., MONDY, N. Purification and characterization of peroxidase isozymes from green peas (*Pisum sativum*). **Food Science**, v.54, n.3, p.644, 1989.
- HILDEBRAND, D.F., HYMOWITZ, T. Two soybean genotypes lacking lipoxygenase-1. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.49, p.33-5, 1981.
- HILDEBRAND, D.F., KITO, M. Role of lipoxygenase in soybean seed protein quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.815-819, 1984.
- HORTON, J.D., CUTHBERT, J.A., SPAKY, D.K. Regulation of hepatic 7 α -hydroxylase expression and response to dietary cholesterol in the rat and hamster. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.10, p.5381-5387, 1995.
- HUFF, M.W., CARROL, K.K. Effects of dietary protein on turnover, oxidation, and absorption of cholesterol, and on steroid excretion in rabbits. **Journal of Lipid Research**, v.21, n.5, p.546-558, 1980.

- HUFF, M.W., HAMILTON, R.M.G., CARROLL, K.K. Plasma cholesterol levels in rabbits fed low fat, cholesterol free, semi-purified diets: effects of dietary proteins, protein hydrolysates and amino acid mixtures. **Atherosclerosis**, v.28, n.2, p.187-195, 1977.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas**. 3. ed. São Paulo: 1985. v 1, 533p.
- IWAMI, K., SAKAKIBARA, K., IBUKI, F. Involvement of post-digestion "hydrophobic" peptides in plasma cholesterol-lowering effect of dietary proteins. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.50, p.1217-1222, 1986.
- JARIWALLA R.J., SABIN, R., LAWSON, S., HERMAN, Z.S. Lowering of serum cholesterol and tryglicerides and modulation of divalent cations by dietary phytate. **Journal of Applied Nutrition**, v.42, p.18-28, 1990.
- JASKIEWICZ, K., WEIGHT, M.J., CHRISTOPHER, K.J., BENADE, A.J.S., KRITCHEVSKY, D. A comparison of the effects of soya-bean protein and casein on bile composition, cholelithiasis, and serum lipoprotein lipids in the vervet monkey (*Cercopithecus aethiops*). **The British Journal of Nutrition**, v.58, n.2, p.257-263, 1987.
- JHAM, G.N., TELES, F.F.F., CAMPOS, L.G. Use of aqueous HCl/MeOH as esterification reagent for analysis of fatty acids derived from soybean lipids. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.59, n.3, p.132-133, 1982.
- KAIBRENER, J.E., WERNER, K., ELDRIDGE, A.C. Flavors derived from linoleic and linolenic acid hydroperoxides. **Cereal Chemistry**, v.51, p.406, 1974.
- KIM, D.N., LEE, K.T., REINER, J.M., THOMAS, W.A. Effects of a soy protein product on serum and tissue cholesterol concentrations in swine fed high-fat, high-cholesterol diets. **Experimental and Molecular Pathology**, v.29, n.3, p.385-399, 1978.
- KIM, D.N., LEE, K.T., REINER, J.M., THOMAS, W.A. Increased steroid excretion in swine fed high-fat, high-cholesterol diet with soy protein. **Experimental and Molecular Pathology**, v.33, n.1, p.25-35, 1980.
- KIRK, E.A., SOUTHERLAND, P., WANG, S.A., CHAIT, A., LEBOEUF, R.C. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. **The Journal of Nutrition**, v.128, n.6, p.954-959, 1998.

- KITAMURA, K. Biochemical characterization of lipoxygenase lacking mutants, L₂-less, L₂-less, and L₃-less soybeans. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.48, n.9, p.2339-2346, 1984.
- KRITCHEVSKY, D., TEPPER, S.A., CZARNECKI, S.K., MUELLER, M.A. KLURFELD, D.M., STORY, J.A. Effects of dietary protein on lipid metabolism in rats. **Journal of The Washington Academy of Science**, v.74, n.1, p.1-8, 1984.
- KUROWSKA, E.M., CARROL, K.K. Hypercholesterolemic responses in rabbits to selected groups of dietary essential amino acids. **The Journal of Nutrition**, v.124, n.3, p364-370, 1994.
- LEE, C.Y., SMITH, N.L., HAWBECKER, D.E. Enzyme activity and quality of frozen green beans as affected by blanching and storage. **Food Quality**, v.11, p.279-287, 1988.
- LEONI, O., IORI, R., PAIMERI, S. Purification and properties of lipoxygenases in germinating sunflower seeds. **The Journal of Food Science**, v.50, p.88-92, 1985.
- LICHTENSTEIN, A.H. Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. **The Journal of Nutrition**, v.128, n.10, p.1589-1592, 1998.
- LIENER, I.E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.34, n.1, p.31-67, 1994.
- LINSCHAEER, W.G., VERGROESEN, A.J. Lipids In: SHILS, M.E., OLSON, J.A., SHIKE, M. **Modern nutrition in health and disease**. 9. ed. Malvern: Lippincott Williams & Wilkins, 1998. p. 67-94.
- LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology, and utilization**. New York: Chapman & Hall; ITP, 1997. 532p.
- LUCAS, B., SOTELO, A. Effect of different alkalies, temperatures and hydrolises times on tryptophan determination of pure proteins and foods." **Analytical Biochemistry**, v.109, n.1, p.192-197, 1980.
- MADANI, S., LOPEZ, S., BLOND, J.P., PROST, J., BELLEVILLE, J. Highly purified soybean protein is not hypocholesterolemic in rats but stimulates cholesterol synthesis and excretion and reduces polyunsaturated fatty acid biosynthesis. **The Journal of Nutrition**, v.128, n.7, p.1084-1091, 1998.
- MCNIVEN, M. Biochemical characterization of low trypsin inhibitor soybean. **Food Science**, v.57, n.6, p.1375, 1992.

- MOORE, S., SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H. Chromatography of amino acid on sulfonated polystyrene resins. **Analytical Chemistry**, v.30, n.7, p.1185-1190, 1958.
- MORAIS, A.A.C., SILVA, A.L. **Soja: suas aplicações**. Rio de Janeiro: Médica e Científica; MDSI, 1996. 259p.
- MURPHY, P.A., SONG, T.T., BUSEMAN, G., BARUA, K., BEECHER, G.R., TRAINER, D., HOLDEN, J. Isoflavones in retail and institutional soy foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, n.7, p.2697-2704, 1999.
- NAGATA, Y. ISHIWAKI, N., SUGANO, M. Studies on the mechanism of the anti-hypercholesterolemic action of soy protein and sot protein-type amino acid mixtures in relation to their casein counterparts in rats. **The Journal of Nutrition**, v.112, n.8, p.1614-1625, 1982.
- NAGATA, Y., TANAKA, K., SUGANO, M. Further studies on the hypocholesterolemic effect of soya-bean protein in rats. **The British Journal of Nutrition**, v.45, n.2, p.233-241, 1981.
- NAGATA, Y., IMAIZUMI, K., SUGANO, M. Effects of soya-bean protein and casein on serum cholesterol levels in rats. **The British Journal of Nutrition**, v.44, n.2, p.113-121, 1980.
- NEGÓCIOS AGRÍCOLAS LTDA. **Quem é quem na produção de soja no mundo**. [05/04/2000]. <http://www.negociosagricolas.com.br/sojamundo.htm>.
- NGUYEN, L.B., SHEFFER, S., SALEN, G., CHIANG, J.Y.L., PATEL, M. Cholesterol 7 α -hydroxylase activities from human and rat liver are modulated in vitro posttranlationally by phosphorylation/dephosphorylation. **Hepatology**, v.24, n.6, p.468-474, 1996.
- NIELSEN, N. C. Structure of soy proteins. In: ALTSCHUL, A. M. e WILCKE, H. L. (Ed.). **New protein foods**. Orlando, FL: Academic Press, 1985. v.5, p. 68-136.
- OZBEN, T. Biliary lipid composition and gallstone formation in rabbits fed on soy protein, cholesterol, casein and modified casein. **Biochemistry Journal**, v.263, n.1, p.293-296, 1989.
- PERKINS, E.G. Composition of soybeans and soy products. In: ERIKSON, D. R. (Ed.). **Practical handbook of soybean processing and utilization**. Champaign, IL: AOCS Press, 1995. p. 9-28.

- POTTER, S.M., BAUM, J.A., TENG, H., STILLMAN, R.J., SHAY, N.F., ERDMAN JR, J. Soy protein and isoflavones: their effect on blood lipids and bone density in postmenopausal women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.68, n.6, p.1375S-1379S, 1998.
- POTTER, S.M. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. **The Journal of Nutrition**, v.125, n.3, p.606S-611S, 1995.
- POTTER, S.M. Soy protein and cardiovascular disease: the impact of bioactive components in soy. **Nutrition Reviews**, v.56, n.8, p.231-235, 1998.
- POTTER, S.M. Soy protein and serum lipids. **Current Opinion of Lipidology**, v.7, n.4, p.260-264, 1996.
- POTTER, S.M., BAKHIT, R.M., ESSEX-SORLIE, D., WEINGARTNER, K.E., CHAPMAN, K.M., NELSON, R.A., PRABHUDESAI, M, SAVAGE, W.D., NELSON, A.I., WINTER, L.W. Depression of plasma cholesterol in men by consumption of baked products containing soy protein. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.58, n.4, p501-506, 1993a.
- POTTER, S.M., JIMENEZ-FLORES, R., POLLACK, J. Protein-saponin interaction and its influence on blood lipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.1287-1291, 1993b.
- RACKIS, J.J., SESSA, D.J., ONG, D.H. Flavors problems of vegetable food proteins. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.56, p.262-271, 1979.
- RAO, A.V., KORATKAR, R. Anticarcinogenic effects of sponins and phytosterols. In: SHAHIDI, F. **Antinutrient and phytochemicals in food**. Washington, DC: American Chemical Society, 1997. p.313-324. (ACS Symposium Series).
- 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. **The Journal of Nutrition**, v.123, n.1, p.1939-1951, 1993.
- REISER, R., HENDERSON, G.R., O'BRIEN, B.C. et al. Hepatic 3-hidroxy-3-methylglutaryl CoA reductase of rats fed semi-purified and stoke diets. **The Journal of Nutrition**, v.107, n. 3, p.453-457, 1977.
- RUDEL, L.L, MORRIS, M. D. Determination of cholesterol using o-phthaladehyde. **Journal of Lipid Research**, v.14, p.364-366, 1973.

- RUDEL, L., DECKELMAN, C., WILSON, M., SCOBAY, M., ANDERSON, R. Dietary cholesterol and down regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and cholesterol absorption in African Green monkeys. **The Journal of Clinical Investigation**, v.93, n.6, p.2463-2472, 1994.
- SAMBROOK, J., MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 210p.
- SANTOS, T.M., SANTOS, J.E. Lipídios In: OLIVEIRA, D., SANTOS, A.C. WILSON, E.D. **Nutrição básica**. São Paulo: Sarvier, 1989. p.15-22.
- SEDIYAMA, T., PEREIRA, M.G., SEDIYAMA, C.S. **Cultura da soja**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, 1985. 96p. (Boletim de extensão).
- SETCHELL, K.D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.68, n.3, p.1333S-1346S, 1998.
- SHANMUGASUNDARAM, S., LI-FEN, C., MAIO-RONG, Y. The Asian vegetable research and development center. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION, 1990, Gongzhuling, China. **Abstracts of the International Conference of Soybean Processing and Utilization**. Gongzhuling: 1990. p.73.
- SHEFER, S., NGUYEN, L.B., SALEN, G., NESS, G.C., CHOWDHARY, I., LERNER, S., BATTI, A.K. Differing effects of cholesterol and taurocholate on steady state hepatic HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase activities and mRNA levels in the rat. **Journal of Lipid Research**, v.33, n.8, p1193-1200, 1992.
- SIRTORI, C.R., EVEN, R., LOVATI, M.R. Soybean protein diet and plasma cholesterol: from therapy to molecular mechanisms. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.676, p.189-201, 1993.
- SIRTORI, C.R., GALLI, G., LOVATI, M.R., CARRARA, P., BOSISIO, E., KIENLE, M.G. Effects of dietary proteins on the regulation of liver lipoprotein receptors in rats. **The Journal of Nutrition**, v.114, n.8, p.1493-1500, 1984.
- SNYDER, H.E., KWON, T.W. **Soybean utilization**. New York: AVI BOOK, 1987. 489p.
- SONG, T., BARUA, K., BUSEMAN, G., MURPHY, P.A. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.68, n.6, p.1474S-1479S, 1998.

- SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H., MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, v.30, p.1190-1196, 1958.
- STATSOFT. **Statistica for Windows: computer program manual**. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2000. Manual eletrônico.
- STIPANUK, M.H. **Biochemical and physiological aspects of human nutrition**. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 2000. 1007p.
- SUGANO, M., Koba, K. Dietary protein and lipid metabolism: a multifactorial effect. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.676, p.215-222, 1993.
- SUGANO, M., TANAKA, K., IDE, T. Secretion of cholesterol, triglyceride and apolipoprotein A-I by isolated perfused liver from rats fed soybean protein and casein or their amino acid mixtures. **The Journal of Nutrition**, v.112, n.5, p.855-862, 1982.
- TANAKA, K., ASO, B., SUGANO, M. Biliary steroid excretion in rats fed soybean protein and casein or their amino acid mixtures. **The Journal of Nutrition**, v.114, n.1, p.26-32, 1984.
- TASKER, T.E., POTTER, S.M. Effects of dietary protein source on plasma lipids, HMG CoA reductase activity, and hepatic glutathione levels in gerbils. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.4, p.458-462, 1993.
- TEIXEIRA, S.R., POTTER, S.M., WEIGEL, R., ERDMAN JUNIOR, J.W., HASLER, C.M. Effects of feeding 4 levels of soy protein for 3 and 6 wk on blood lipids and apolipoproteins in moderately hypercholesterolemic men. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, n.5, p.1077-1084. 2000.
- TOVAR-PALACIO, C., POTTER, S.M., HAFERMANN, J.C., SHAY, N.F. Intake of soy protein and soy protein extracts influences lipid metabolism and hepatic gene expression in gerbils. **The Journal of Nutrition**, v.128, n.5, p.839-842, 1998.
- TSANG, S.S., YIN, X., GUZZO-ARKURAN, C., JONES, V.S., DAVISON, A.J. Loss of resolution in gel electrophoresis of RNA: a problem associated with the presence of formaldehyde gradients. **Biotechniques**, v.14, n.3, p.380-381, 1993.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. **Nutrient Database for Standard Reference. Food Group 16: Legumes and Legume products**. Release 12. [S.I.]:1998. [10/05/2000] (<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>).

- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. **Iowa State University on the Isoflavone content of foods**. [S.l.]:1999. [10/05/2000]. (<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>).
- VAN DER MEER, R., BEYNEN, A.C. Species-dependent responsiveness of serum cholesterol to dietary proteins. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.64, p.1172-1177, 1987.
- VAN DER MEER, R., VRIES, H.T., VAN TINTELEN, G. The phosphorylation state of casein and the species-dependency of its hypercholesterolemic effect. The **British Journal of Nutrition**, v.59, n.3, p.467-473, 1988.
- XU, G., SALEN, G., SHEFER, S., TINT G.S., NGUYEN, L.B., PARKER, T.T., CHEN, T.S., ROBERTS, J., KONG, X., GREENBLATT, D. Regulation of classic and alternative bile acid synthesis in hypercholesterolemic rabbits: effects of cholesterol feeding and bile acid depletion. **Journal of Lipid Research**, v.39, n.8, p.1608-1615, 1998.
- WANG, H.J., MURPHY, P.A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year and location. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.1674-1677, 1994a.
- WANG, H.J., MURPHY, P.A. Isoflavone content in commercial soybean foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.1666-1673, 1994b.
- WHITNEY, E.N., ROLFES, S.R. **Understanding Nutrition**. 8. ed. Belmont, CA: Wadsworth, 1999. 647p.
- WILSON, J.D. The quantification of cholesterol excretion and degradation in the isotopic steady state in the rat: the influence of dietary cholesterol. **Journal of Lipid Research**, v.5, n.3, p.409-417, 1964.
- YADAV, N.R., LIENER, I.E. Reduction of serum cholesterol in rats fed vegetable protein or an equivalent amino acid mixture. **Nutrition Reports International**, v.5, n.4, p.385-389. 1977.
- WOLF, W.J., COWAN, J.C. **Soybeans as a food source**. Cleveland, OH: CRC Press, 1975. 376p.
- YAZDI-SAMADI, B., RINNE, R.W., SEIF, R.D. **Components of developing soybean seeds: oil, protein, sugars, starch, organic acids, and amino acids**. Madison: Agron, 1977. v. 69, 481p.
- ZARCADAS, C.G., YU, Z., VOLDENG, H.D., HOPE, H.J., MINERO-AMADO, A., ROCHEMONT, J.A., Comparison of the protein-bound and free amino acids contents of two northern adapted cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.21-33, 1994.

ZARCADAS, C.G., YU, Z., VOLDENG, H.D., MINERO-AMADO, A. Assessment of the protein quality of a new high-protein soybean cultivar by amino acid analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.616-623, 1993.

ZHOU, J.R., ERDMAN JUNIOR, J.W. Phytic acid in health and disease. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, n.6, p.495-508, 1995.

ZUBAY, G. **Biochemistry**. 4. ed. Portland, Or: Wm. C. Brown Publishers, 1999. 1024p.