

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E NUTRIÇÃO**

***VITAMINA E DO DESTILADO DA DESODORIZAÇÃO DO ÓLEO
DE SOJA E SOB FORMA DE FÁRMACO NA PREVENÇÃO À
OXIDAÇÃO DOS LÍPIDES E DA NECROSE HEPÁTICA
DECORRENTE DE DIETA DEFICIENTE EM CISTINA PARA
RATOS***

**CRISTINA MACHADO BRAGANÇA DE MORAES
Nutricionista**

**PROF. DR. ADMAR COSTA DE OLIVEIRA
Orientador**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, para a obtenção do título de Mestre em Ciência da Nutrição.

**CAMPINAS – SP
2003**

VITAMINA E DO DESTILADO DA DESODORIZAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA E SOB FORMA DE FÁRMACO NA PREVENÇÃO À OXIDAÇÃO DE LÍPIDES E DA NECROSE HEPÁTICA DECORRENTE DE DIETA DEFICIENTE EM CISTINA PARA RATOS

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Faculdade de Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de Mestre em Ciência da Nutrição.

BANCA EXAMINADORA

PROF. DR. ADMAR COSTA DE OLIVEIRA

Orientador

PROF. DR. CÉLIO KENJI MIYASAKA

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

PROF. DRA. MARIA DO CARMO ALBERTO RINCON

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

PROF. DRA. SEMIRAMIS MARTINS ALVARES DOMENE

Pontifícia Universidade Católica de Campinas - PUC

Dedico este trabalho com todo o meu amor e gratidão à minha mãe, pelo que ela é e sempre será em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por tudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira, pelo convívio, apoio, amizade e confiança em mim depositados por toda essa caminhada.

Ao meu amado pai, José Carlos, e toda a minha família, alguns que estiveram próximos e outros mais distantes, mas que sempre torceram pela minha vitória neste trabalho.

Ao meu querido namorado Nicola, que com muita paciência e compreensão ouvia meus resmungos de saudade da minha casa ou meus mal humores pelas coisas que nem sempre davam certo, mas que sempre com muito amor esteve do meu lado.

A minha grande amiga-irmã Karina, pelo apoio, amizade e respeito, que fez com que nossa convivência por esses anos fosse maravilhosa.

Aos queridos amigos e colegas, Soely, Keila, Giovana, Adriane, Claudia, Lilia, Camila, Suzana e todos os outros que infelizmente não poderei citar todos, pelo apoio, amizade dedicada, companheirismo e agradável convivência.

A Prof. Dr. Maria do Carmo Alberto Rincon, o meu obrigado e minha admiração especial, pelo auxílio na realização da análise dos exames histológicos e é claro pela amizade a mim dedicada.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões apresentadas.

A Granol Industria e Comércio S.A., pela doação do DDOS.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), pela doação do feijão utilizado neste trabalho.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), pela utilização do liofilizador para o processamento do feijão.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização do meu trabalho, o meu respeito e gratidão.

SUMÁRIO

INDICE GERAL	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÕES	57
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

INDICE GERAL

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Vitamina E	5
2.2 Destilado da Desodorização do Óleo de Soja (DDOS)	10
2.3 Feijão-comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> , L.)	12
2.4 Fisiologia do fígado	13
2.5 Constituição histológica	14
2.6 Necrose hepática	16
2.7 Peroxidação dos ácidos graxos	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Material	28
3.1.1 Fontes protéicas	28
3.1.2 Animais para experimentação	28
3.1.3 Fontes de vitamina E	28
3.2 Métodos	29
3.2.1 Determinações químicas	29
3.2.1.1 Composição centesimal	29
3.2.1.1.1 Proteína Bruta	29
3.2.1.1.2 Lipídios totais	29
3.2.1.1.3 Fibra bruta	29
3.2.1.1.4 Umidade	30

3.2.1.1.5	Cinzas	30
3.2.1.1.6	Carboidratos	30
3.2.1.2	Determinação do aminograma do Feijão-comum	30
3.2.1.3	Determinação de vitamina E	31
3.2.1.4	Determinação de bilirrubina na urina	31
3.2.1.5	Determinação da oxidação de lípides hepáticos	31
3.2.2	Exame histológico	32
3.2.3	Ensaio biológico	32
3.2.3.1	Dietas experimentais e tratamentos	32
3.2.3.2	Procedimento experimental	36
3.3	Análise Estatística	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	Determinações químicas	40
4.1.1	Composição centesimal	40
4.1.2	Aminograma do feijão-comum	41
4.1.3	Determinação de vitamina E	43
4.1.4	Determinação de bilirrubina na urina	43
4.1.5	Determinação da oxidação de lípides hepáticos	43
4.2	Exame histológico	45
4.3	Ensaio biológico	51
5	CONCLUSÕES	57
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico.	34
Tabela 2. Mistura mineral utilizada nas dietas experimentais segundo a formulação da AIN-93G.	35
Tabela 3. Mistura vitamínica utilizada nas dietas experimentais segundo a formulação da AIN-93G.	36
Tabela 4. Composição centesimal do feijão-comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> , L.) cultivar IAC-Carioca cozido e liofilizado, utilizado como fonte protéica nas dietas experimentais.	40
Tabela 5. Composição de aminoácidos do feijão-comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> , L.) cultivar IAC-Carioca utilizado no experimento e padrão aminoacídico para proteínas de alta qualidade, preconizada pela “Food and Nutritional Board”.	42
Tabela 6. Ganho de peso (g), consumo de proteína (g), Quociente de Eficiência Protéica (PER) e Quociente de Conversão Alimentar (QCA) das dietas experimentais.	44
Tabela 7. Digestibilidade aparente e digestibilidade corrigida pela dieta aprotéica (%) após 4 dias de balanço de nitrogênio nos animais submetidos aos tratamentos.	51
Tabela 8. Resultados das determinações de TBA nos fígados liofilizados dos animais submetidos aos tratamentos.	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura dos isômeros dos tocoferóis e tocotrienóis.	8
FIGURA 2. Fases da peroxidação lipídica	23
FIGURA 3. Ação da vitamina E	25
FIGURA 4. Fotomicrografia de fígado (Grupo Controle), tempo final (57 dias). HE. 90X.	46
FIGURA 5. Fotomicrografia de fígado (Grupo Controle), tempo final (57 dias). HE. 180X.	46
FIGURA 6. Fotomicrografia de fígado (Grupo EP), tempo final (57 dias). HE. 90X.	47
FIGURA 7. Fotomicrografia de fígado (Grupo EP), tempo final (57 dias). HE. 180X.	47
FIGURA 8. Fotomicrografia de fígado (Grupo DD), tempo final (57 dias). HE. 90X.	48
FIGURA 9. Detalhe da Figura 6. HE. 180X.	48

FIGURA 10. Fotomicrografia de fígado (Grupo DE), tempo intermediário (40 dias). HE. 90X.	49
FIGURA 11. Detalhe da Figura 8. HE. 180X.	49
FIGURA 12. Fotomicrografia de fígado (Grupo DE), tempo final (57 dias). HE. 90X.	50
FIGURA 13. Detalhe da Figura 10. HE. 180X.	50
FIGURA 14. Evolução ponderal dos ratos durante 4 dias de adaptação às dietas experimentais, seguidos de 28 dias para cálculo do Quociente de Eficiência Protéica (PER) e Quociente de Conversão Alimentar (QCA).	53
FIGURA 15. Quociente de Eficiência Protéica (PER) e Quociente de Conversão Alimentar (QCA) dos grupos experimentais.	54

RESUMO

RESUMO

A finalidade deste trabalho foi avaliar a ocorrência de necrose hepática em ratos Wistar submetidos a dietas deficientes em cistina e vitamina E, ocorrência muito citada em artigos realizados na década de 50. O exame histológico foi utilizado para avaliar a presença de necrose hepática e a análise da oxidação dos lípides hepáticos foi medida pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA). A dosagem de bilirrubina urinária também foi utilizada como indicativo da existência de necrose hepática. As dietas experimentais seguiram a formulação da dieta AIN-93G, utilizando-se como fonte protéica o feijão-comum (12%). A opção pelo feijão-comum foi feita por ser uma fonte de proteína deficiente em aminoácidos sulfurados, principalmente a cistina, e também um dos alimentos mais consumidos pela população brasileira. Foram utilizados ratos Wistar ($68,0 \pm 13,1$ g) que foram divididos em 5 grupos experimentais: grupo CO (controle), que recebeu dieta AIN-93G contendo feijão-comum como fonte protéica; grupo DE, que recebeu dieta AIN-93G contendo feijão-comum como fonte protéica, porém depletada em cistina e vitamina E; grupo EP, que recebeu dieta AIN-93G contendo feijão-comum como fonte protéica, depletada em cistina e vitamina E, com suplementação de vitamina E através do fármaco EPHINAL[®], em quantidade equivalente a 50mg/dia da vitamina; grupo DD, que recebeu dieta AIN-93G contendo feijão-comum como fonte protéica, depletada em cistina e vitamina E com suplementação de vitamina E através do Destilado da Desodorização do Óleo de Soja (DDOS) em quantidade equivalente a 50mg/dia da vitamina; grupo AP (aprotéico), para fins de correção dos dados. A título de monitoramento, durante o período experimental foram avaliados, o ganho de peso dos

animais, o Quociente de Eficiência Protéica (PER), o Quociente de Conversão Alimentar (QCA) e a digestibilidade protéica. Houve diferença significativa entre todos os grupos, para o ganho de peso, o PER e o QCA ($p < 0,05$) sendo que os menores valores foram encontrados para os grupos suplementados, possivelmente pela suplementação ter ocasionado saciedade nos animais que, via de conseqüência, ingeriram menos dieta. Com relação à digestibilidade corrigida pela dieta aprotéica, verificou-se que os grupos CO e EP apresentaram o mesmo valor, 59,6%, e superior aos grupos DE e DD que apresentaram valores de 54,5 e 56,4% respectivamente, não diferindo significativamente. Aos 40 dias e no final do experimento, 57 dias, os animais tiveram seus fígados dissecados e amostras do lobo lateral esquerdo foram coletadas para exame histológico, sendo o restante dos fígados congelados em nitrogênio líquido e liofilizados para análise de TBA. A análise dos cortes histológicos não apresentou alterações estruturais entre o fígado dos animais dos grupos controle e experimentais. As concentrações de TBA foram significativamente maiores nos animais do grupo DE ($46,2 \pm 10,3 \text{ mg/Kg}$) quando comparadas às dos demais grupos, o que demonstrou maior nível de oxidação hepática neste grupo. Os grupos suplementados com vitamina E (EP e DD), apresentaram proteção contra a oxidação hepática. Pôde-se, portanto, concluir que utilizando estas condições experimentais, dietas deficientes em aminoácidos sulfurados, especialmente a cistina, não causaram o aparecimento de necrose hepática.

ABSTRACT

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the occurrence of hepatic necrosis in Wistar rats fed on diets deficient in cystine and vitamin E, an occurrence cited with frequency in articles published in the fifties. A histological examination was used to evaluate the presence of hepatic necrosis and the analysis of oxidation of the hepatic lipids was measured by the thiobarbituric acid (TBA) method. The level of urinary bilirubin was also used as an indication of the existence of hepatic necrosis. The experimental diets were formulated according to the AIN-93G diet, using the common bean (12%) as the protein source. The common bean was chosen since its protein is deficient in sulfur amino acids, principally in cystine, and is also one of the food items most consumed by the Brazilian population. Wistar rats were used (68.0 ± 13.1 g) divided into 5 experimental groups: group CO (control), which received the AIN-93G diet containing the common bean as protein source; group DE, which received the AIN-93G diet containing the common bean as protein source, but depleted in cystine and vitamin E; group EP, which received the AIN-93G diet containing the common bean as protein source, depleted in cystine and vitamin E but supplemented by vitamin E in the form of the pharmaceutical EPHINAL[®] at a rate equivalent to 50mg/day of the vitamin; group DD, which received the AIN-93G diet containing the common bean as protein source, depleted in cystine and vitamin E but supplemented with vitamin E using deodorized soybean oil distillate (DSOD) at a rate equivalent to 50mg/day of the vitamin; group AP (aproteic), used to correct the data. During the experimental period, the following parameters were monitored: weight gain of the animals, protein efficiency ratio (PER), the food conversion ratio (FCR) and the protein

digestibility. There was a significant difference between all the groups with respect to weight gain, PER and FCR ($p < 0.05$) the lowest values being found for the supplemented groups, possibly because the supplementation provided a feeling of satisfaction to the animals who consequently consumed less diet. With respect to digestibility, corrected by the aproteic diet, groups CO and EP showed the same value, 59.6%, greater than groups DE and DD which presented values of 54.5 and 56.4% respectively, not differing significantly. After 40 days and at the end of the experiment (57 days), the livers of animals were dissected and samples from the left lateral lobe collected for the histological examination, the rest of the liver being frozen in liquid nitrogen and freeze dried for the TBA analysis. The histological examination showed that there were no structural alterations in the liver of the control group, as well as in the experimental animals. The TBA concentration of the group DE ($46,2 \pm 10,3 \text{ mg/Kg}$) showed a higher level of hepatic oxidation, when compared with the other groups. The supplemented groups EP and DD presenting protection against oxidation. Thus it can be concluded that under these experimental conditions, diets deficient in sulfur amino acids, especially in cystine, do not result in the appearance of hepatic necrosis.

1 INTRODUÇÃO

A vitamina E é o mais abundante antioxidante natural responsável pela proteção de membranas celulares contra a peroxidação lipídica. Algumas funções da vitamina E tem sido relatadas como um antioxidante, atuante no metabolismo de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, função mitocondrial, produção de hormônios sexuais, proteção contra anemia hemolítica, redução de riscos de doenças cardíacas, câncer, doenças neurológicas e cataratas (TAKUR & SRIVASTA, 1996). A vitamina E é dividida em 2 grupos distintos, os tocoferóis e os tocotrienóis. Ambos os grupos são divididos em isômeros, alfa, beta, gama e delta, sendo que a absorção do α -tocoferol acontece em maior grau no organismo, fazendo com que esta porção da vitamina E apresente maior importância biológica que as demais (AZZI & STOCKER, 2000). As principais fontes de vitamina E são as sementes oleaginosas como a soja, algodão, milho, girassol e gérmen de trigo (SGARBIERI, 1987).

Um dos subprodutos ou resíduo da indústria do óleo de soja, o destilado da desodorização do óleo de soja (DDOS), é uma fonte com quantidades consideráveis de vitamina E e vem sendo estudada para ser utilizada como antioxidante natural em alimentos (HASSAN EL-MALLAH *et alii*, 1990), porém o Brasil ainda não dispõe de tecnologia adequada para a recuperação dos tocoferóis a partir do DDOS (ALMEIDA, 2000). Sendo assim, optou-se por utilizá-lo em sua forma *in natura* como fonte de vitamina E neste trabalho.

Na década de 50 foi verificado que ratos submetidos a dietas deficientes em cistina e vitamina E apresentavam a partir de

aproximadamente 45 dias uma necrose hepática assintomática, e quando isso acontecia, era súbita e fatal (SCHWARZ, 1954). Desde então, não foram encontradas referências relatando este fato. HARPER *et alii* (1982) mencionaram a necrose assintomática e fatal, porém referindo-se aos mesmos artigos realizados na década de 50.

O feijão faz parte da dieta básica dos brasileiros, como umas das principais fontes de proteína ou mesmo como única fonte protéica de grande parte da população. Porém, as proteínas de origem vegetal apresentam qualidade inferior quando comparadas às de origem animal, com menor digestibilidade e limitações de aminoácidos essenciais. Em especial o feijão é caracterizado pela baixa digestibilidade e deficiência de aminoácidos sulfurados, principalmente a cistina (MODGIL & MEHTA, 1997; SGARBIERI & WHITAKER, 1982), o que o torna uma fonte protéica adequada às necessidades deste trabalho.

Assim sendo, não se conseguindo ter às mãos trabalhos mais atualizados, confirmando ou mesmo desmistificando tal fato, e sendo o Brasil um dos maiores consumidores de uma fonte protéica deficiente em cistina, o feijão, houve uma motivação na realização deste estudo com o propósito de verificar efetivamente a existência desta necrose e ainda avaliar a possível utilização do DDOS como fonte alternativa de vitamina E.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 VITAMINA E

A vitamina E tem sido reconhecida como a vitamina antiesterelidade, desde sua descoberta por Evans & Bishop em 1922, como fator lipossolúvel em lípidos capaz de prevenir a reabsorção de fetos em ratas e a degeneração testicular em ratos (AZZI & STOCKER, 2000; SGARBIERI, 1987; PIKE & BROWN, 1984; HARPER *et alii*, 1982). Além do fator antiesterelidade, a vitamina E também está sendo reconhecida como excelente antioxidante biológico que protege membranas celulares e inibe a oxidação dos ácidos graxos (MACHLIN, 1984; BURTON *et alii*, 1983), além de aumentar a estabilidade oxidativa de óleos vegetais e gorduras animais (HAUMANN, 1990).

Segundo TAKUR & SRIVASTA (1996), a vitamina E é o mais abundante antioxidante lipossolúvel natural responsável pela proteção de membranas celulares contra a peroxidação lipídica. Algumas funções da vitamina E são relatadas como um antioxidante, atuante no metabolismo de prostaglandinas, no metabolismo de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, função mitocondrial, produção de hormônios sexuais, proteção contra anemia hemolítica, redução dos riscos de doenças cardíacas, câncer, doenças neurológicas e cataratas.

Na ausência de vitamina E os ácidos graxos insaturados dos fosfolípidos das membranas são oxidados, gerando hidroperóxidos instáveis que iniciam as reações de autooxidação (BURGEOIS, 1992). O papel primário da vitamina E é interromper a cadeia de propagação de

radicais livres, na fase da autooxidação lipídica pela doação de seu hidrogênio aos radicais livres peróxidos (HENNEKENS & GAZIANO, 1993; MACHLIN, 1987). BLOCK & LANGSETH (1994) relacionaram o efeito da oxidação sobre vários estágios de doenças, entre elas incluem-se: câncer – através do início da carcinogênese, promoção do desenvolvimento de tumores, mutagênese e transformação da divisão celular; doenças cardiovasculares, através da oxidação das lipoproteínas do sangue e o desenvolvimento de aterosclerose e efeitos danosos sobre tecidos ocasionando os ataques cardíacos; catarata – pelos danos oxidativos às membranas oculares.

A variedade de sintomas de deficiência de vitamina E pode ser devido ao ataque peroxidativo sobre membranas fosfolipídicas, proteínas, e outras macromoléculas em diferentes tecidos. Os sintomas de carência de vitamina E variam para as diferentes espécies de animais: em coelhos e cobaias ocorre creatinúria e distrofia muscular, em galináceos observa-se anomalia vascular, distrofia muscular e encefalomalácia (SGARBIERI, 1987). Na espécie humana a carência de vitamina E, ainda que existam várias observações que apresentem evidências sugestivas de que tais fatos possam ocorrer, nenhum quadro clínico comparável foi conclusivamente demonstrado. Entretanto, outros sintomas já foram relatados, como a degeneração hepática e alterações nas funções de membranas plasmáticas, devido ao ataque destrutivo do oxigênio sobre os lipídios das membranas celulares, o que é, em grande parte, prevenida ao nível celular pela ação antioxidante da vitamina E (PIKE & BROWN, 1984).

A ausência de vitamina E em ratos provoca uma depleção em vários tecidos. Alguns tecidos, como o adiposo, fígado e músculo são considerados os maiores depósitos de vitamina E. Contudo estas reservas presentes nos tecidos não podem ser liberadas ou disponíveis para suas necessidades quando as fontes de vitamina E nas dietas estiverem baixas ou ausentes. Outros estudos têm confirmado que ratos com dietas deficientes nesta vitamina sofrem depleção relativamente rápida no plasma e fígado, lenta no coração e muito mais lenta no tecido adiposo (NELSON *et alii*, 1980).

A necessidade para a atividade antioxidante da vitamina E depende até certo ponto do nível de ácidos graxos polinsaturados (AGPI) facilmente peroxidados na dieta. Quanto maior a ingestão de AGPI, maior a necessidade de vitamina E (ROBBINS, 1986). Membranas celulares de animais ricas em AGPI ficam mais suscetíveis ao ataque oxidativo em uma deficiência de antioxidante, portanto o requerimento de vitamina E fica aumentado (SGARBIERI, 1982).

A denominação tocoferol é derivada das palavras gregas “tokos” (parto) e “phero” (suportar a dificuldade), mas a importância biológica dos tocoferóis é muito maior do que a etimologia da palavra pode estar indicando (PIKE & BROWN, 1984). Os compostos que compreendem o grupo de vitamina E são divididos em dois grupos distintos, ambos derivados de um anel 6-cromanol. O primeiro grupo, os tocoferóis, derivam do tocol, contém uma cadeia lateral isoprenóide saturada de 16 carbonos; o segundo grupo, os tocotrienóis, contém uma cadeia lateral com tripla insaturação. Dentro de cada série, os compostos somente diferem no

número e na posição de grupos metilo no anel aromático. Tanto os tocoferóis como os tocotrienóis possuem formas isoméricas, designadas, alfa, beta, gama e delta. Com relação aos tocoferóis, a absorção no organismo é seletiva, com preferência ao α -tocoferol, sendo os demais absorvidos em menor grau (AZZI & STOCKER, 2000).

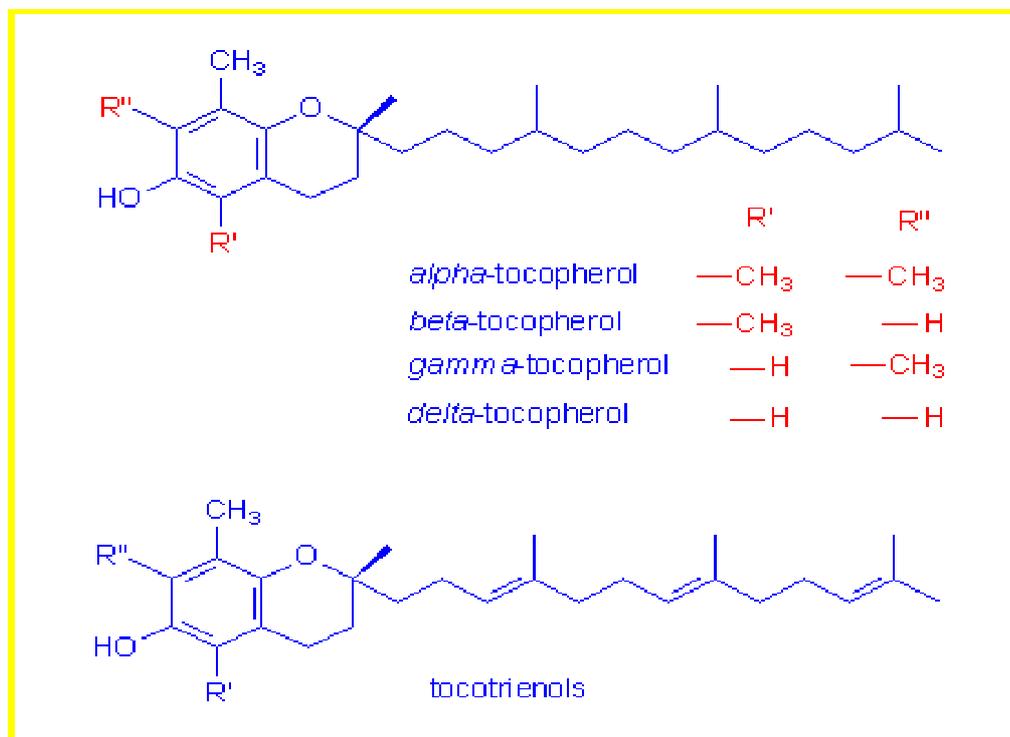


Figura 1. Estrutura dos isômeros dos tocoferóis e tocotrienóis.

O α -tocoferol é o isômero mais largamente distribuído na natureza e o mais biologicamente ativo de todos os compostos com atividade vitamínica E. A atividade antioxidante e biológica dos vários isômeros dos tocoferóis são diferentes, sendo que o δ -tocoferol tem somente 50% da atividade do α -tocoferol, apesar de ser a principal forma existente na dieta

humana (KAYDEN & TRABER, 1993). O β e o γ -tocoferol possuem respectivamente 40% e 10% de atividade em relação ao α -tocoferol. Os tocoferóis são potentes antioxidantes e funcionam, pelo menos em parte, protegendo outros nutrientes, como a vitamina A e os ácidos graxos poliinsaturados da degradação oxidativa (SGARBIERI, 1987).

A vitamina E é encontrada principalmente em plantas e, em altas concentrações, em sementes oleaginosas como a soja, algodão, milho, girassol, e gérmen de trigo. Óleos de oliva, coco e amendoim apresentam teores baixos desta vitamina. Os tecidos animais, bem como frutas e hortaliças em geral, também apresentam pequenas quantidades de vitamina E. Nos alimentos ou nas dietas contendo vitamina E, o teor é expresso em “mg de equivalente de α -tocoferol”. Os tocoferóis estão presentes em óleos de sementes, folhas e outras partes verdes de plantas superiores. O α -tocoferol é encontrado principalmente dentro dos cloroplastos, enquanto os demais homólogos estão fora deles (HESS, 1993). Os tocotrienóis ao contrário não se encontram nas partes verdes, e sim, no gérmen e farelo de sementes de cereais (COMBS, 1992). O teor de vitamina E total e sua distribuição nos alimentos são variados dependendo da espécie, variedade, estado de maturação, meio ambiente onde se cultiva a espécie, forma de colheita, processamento e armazenamento. Alimentos de origem animal geralmente são pobres em tocoferóis, pois nesses organismos sua concentração depende da alimentação do animal (BAUERNFEIND, 1980).

A crescente utilização dos tocoferóis como antioxidante se deve ao fato do aumento contínuo do consumo de produtos naturais por parte da população mundial. A aplicação desses compostos nos alimentos, como forma de manter a sua estabilidade oxidativa, economicamente é desvantajosa quando comparada ao emprego de antioxidantes sintéticos. Além dos níveis de dosagem necessários serem mais elevados (cerca de 3 vezes mais), os tocoferóis também são caros quando comparados ao mais caro dos antioxidantes sintéticos (ALMEIDA, 2000). Apesar destes fatores, as indústrias de óleos e/ou gorduras têm sido pressionadas pelos consumidores a buscar fontes naturais alternativas aos antioxidantes sintéticos, principalmente após o ano de 1990, quando o butilato de hidroxianisol (BHA) foi indicado como sendo um composto carcinogênico, em testes realizados com animais de laboratório pela International Agency for Research in Câncer. O consumo mundial de tocoferóis, como antioxidante, foi estimado em 150 toneladas anuais (HAUMANN, 1990).

2.2 DESTILADO DA DESODORIZAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA (DDOS)

Os óleos vegetais passam por um processo de refino que consiste basicamente em degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização, resultando em vários subprodutos que eficientemente recuperados podem alcançar alto valor comercial. Um desses subprodutos é o destilado da desodorização do óleo de soja (DDOS), obtido na etapa de desodorização do óleo de soja. Este subproduto ou resíduo, corresponde a 0,1 a 0,4% da massa original do óleo (ALMEIDA, 2000).

A desodorização de óleos comestíveis é um processo que remove substâncias voláteis que conferem odor e sabor indesejáveis ao óleo. Este procedimento é geralmente conduzido em uma corrente de vapor, sob vácuo e temperaturas elevadas. As principais substâncias removidas nesta etapa são hidrocarbonetos, tocoferóis, esteróis, ácidos graxos e acilgliceróis (HASSAN EL-MALLAH *et alii*, 1990). Devido ao seu alto conteúdo de tocoferóis totais, 8,5 a 12,4% encontrados por AUGUSTO (1988) e 9,5 a 11,2% encontrados por ALMEIDA (2000), o DDOS vem sendo estudado no sentido de ser utilizado como antioxidante natural em alimentos (HASSAN EL-MALLAH *et alii*, 1990). WATSON & MEIRHOEFER (1976) citam a utilização do DDOS como suplemento alimentar para animais. Em Israel este resíduo é utilizado como aditivo alimentar em ração para aves (SHEABAR & NEEMAN, 1987). No Brasil, algumas pesquisas já foram realizadas utilizando DDOS. DIAZ (1987) testando este resíduo como antioxidante na farinha de sardinha, em substituição aos produtos sintéticos comumente usados em ingredientes e rações animais, observou que o nível de apenas 1% de adição foi suficiente para retardar a oxidação lipídica por um período de 150 dias de armazenamento contra 45 dias sem aditivos.

O Brasil embora seja um país potencialmente rico em fontes de tocoferóis, não dispõe de tecnologia adequada para sua produção industrial. A tecnologia para recuperação de tocoferóis a partir do DDOS pertence a empresas multinacionais e é mantida em segredo industrial ou é patenteada pelas mesmas. Atualmente, o DDOS é exportado como um subproduto e retorna ao Brasil como um produto de alto valor comercial, que são os concentrados de tocoferóis ou vitamina E, para uso da indústria

farmacêutica, cosmética e de rações. Somando-se a isto, há uma tendência atual no aumento da preferência ao uso de antioxidantes e vitaminas naturais, sendo que, a vitamina E natural leva a vantagem em relação à produzida sinteticamente por possuir potencial biológico mais elevado (ALMEIDA, 2000).

2.3 FEIJÃO-COMUM (*Phaseolus vulgaris*, L.)

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*), é uma das leguminosa mais produzidas e mais consumidas mundialmente, além de ser a principal fonte de proteína das famílias de baixa renda distribuída pelo mundo inteiro (HUGES *et alii*, 1996).

O elevado custo para a produção de proteína de origem animal reflete-se no aumento da produção de fontes protéicas de menor custo para o consumo humano, com ênfase para as proteínas de origem vegetal. Porém, as proteínas vegetais, apresentam menor qualidade, quer seja pela baixa digestibilidade, limitação de aminoácidos sulfurados ou ainda pela presença de substâncias comprometedoras da biodisponibilidade das proteínas e minerais (MODGIL & MEHTA, 1997; SGARBIERI & WHITAKER, 1982; CARPENTER, 1981). Segundo DESHPANDE & NIELSEN (1987), a digestibilidade é determinada pela presença de fatores antinutricionais, estrutura da proteína, complexação da proteína com amido, hemiceluloses e outros minerais. O conteúdo protéico encontrado no feijão varia de 16 a 33% (SGARBIERI & WHITAKER, 1982). A

digestibilidade protéica é baixa, cerca de 65% (MARQUEZ & LAJOLO, 1991; SGARBIERI, 1989).

A composição de aminoácidos do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) tem sido estudada por inúmeros pesquisadores. Os resultados encontrados de maior ênfase foram: a quantidade limitante de aminoácidos sulfurados como a metionina e a cistina, a baixa concentração de triptofano e a alta concentração de lisina (SGARBIERI, 1989). Este mesmo autor encontrou 0,84-1,50g/100g de proteína para a metionina e traços-1,29g/100g de proteína para a cistina ao analisar 120 variedades de *Phaseolus vulgaris*. Ainda, analisando esta mesma espécie, OLIVEIRA (1986) encontrou 1,0g/16g N para a metionina e 0,3g/16g N para a cistina, no cultivar Carioca 80, utilizado no presente trabalho. Por estes resultados, optou-se pelo feijão-comum para ser utilizado como fonte protéica nas dietas experimentais.

2.4 FISIOLOGIA DO FÍGADO

No organismo, o fígado além de atuar na defesa, no sistema hormonal e ser reservatório de sangue, é a sede dos processos bioquímicos relacionados com o metabolismo de nutrientes (JONG, 1997). O fígado do rato é dividido em quatro lobos: o mediano, o lateral direito, o caudal e o cranial. A fissura profunda do mediano auxilia sua identificação assim como a fissura do lateral direito que é parcialmente dividido em porção caudal e cranial. O lobo caudal caracteriza-se por ser pequeno e estar encaixado ao redor do esôfago (BAKER *et alii*, 1979).

As diversas zonas do fígado podem apresentar diferentes funções. As células da zona periportal participam da glicólise anaeróbica, enquanto as da área centroglobular são particularmente importantes no metabolismo aeróbico dos hidratos de carbono. Os hepatócitos perfazem cerca de 60% do peso do fígado e tem vida média de 191 a 453 dias (SASSE *et alii*, 1992). Segundo JUNGEMANN (1992), o hepatócito é a célula que tem mais funções no organismo, e esta diversidade funcional é refletida em sua estrutura. Segundo ele as funções do hepatócito se dividem em quatro grandes funções: 1) Centro do metabolismo, através da captação e liberação de glicose, produção de corpos cetônicos, produção de uréia, captação e liberação de aminoácidos, processamento de lípidos, biossíntese e biodegradação, síntese e degradação de proteínas plasmáticas e formação de bile. 2) Centro de defesa: através do metabolismo de xenobióticos, fagocitose e eliminação bioquímica de moléculas estranhas e agregados macromoleculares, eliminação de células tumorais. 3) Posto de controle do sistema hormonal: através da inativação e eliminação de hormônios mediadores e síntese e liberação de (pro) hormônios. 4) Reservatório de sangue: estoque de sangue ativo e passivo.

2.5 CONSTITUIÇÃO HISTOLÓGICA DO FÍGADO

O hepatócito, principal célula formadora do fígado, apresenta forma relativamente prismática onde duas de suas faces são adjacentes aos sinusóides e as outras se relacionam com os canálculos biliares ou estão em contato com a face da célula vizinha. O hepatócito apresenta

numerosas microvilosidades com forte atividade enzimática confirmando o papel ativo da membrana na secreção e absorção. Na face de contato com o hepatócito vizinho a superfície da membrana é relativamente lisa com poucas digitações e cavidades. Nos cortes histológicos o citoplasma do hepatócito não é homogêneo contendo grânulos e vacúolos. Em condições normais, as células hepáticas armazenam glicogênio em quantidades que variam de acordo com a dieta, com o estado nutricional, com o sexo e com a espécie animal (CAMARGO *et alii*, 1978).

As células hepáticas se agrupam em placas que se anastomosam entre si formando os chamados lóbulos hepáticos. Os lóbulos hepáticos são divididos entre si por vasos e tecido conjuntivo que são as regiões que ocupam os cantos dos poliedros, as quais se convencionou chamar de **espaços porta**. Cada espaço porta apresenta no seu interior uma vênula e uma arteríola, que são ramos da veia porta e da artéria hepática, um ducto biliar e vasos linfáticos, envoltos por uma bainha de tecido conjuntivo. No lóbulo, as células hepáticas ou hepatócitos dispõem-se em placas orientadas radialmente. Essas placas celulares são perfuradas e, freqüentemente, anastomosam-se, dando ao lóbulo hepático um aspecto esponjoso. O espaço que fica entre as placas de células hepáticas é ocupado por capilares sinusóides chamados **sinusóides hepáticos**, que são capilares de paredes revestidas por dois tipos celulares: as células endoteliais típicas dos capilares sanguíneos e macrófagos que, neste órgão, são chamados de **células de Kupffer**. Estas células são estreladas, de núcleo oval, grande, e nucléolo evidente. Apresentam intensa atividade fagocitária, onde ocorre a fagocitose de hemácias em via de desintegração, com a conseqüente digestão da hemoglobina e produção de bilirrubina. O capilar

sinusóide hepático apresenta-se envolto por um delicado arcabouço de fibras reticulares. O estreito espaço que separa as paredes dos capilares sinusóides dos hepatócitos chama-se **espaço de Disse**. É neste espaço que se encontram as células armazenadoras de lipídios, as quais armazenam vitamina A em suas gotículas lipídicas. O revestimento dos capilares sinusóides do fígado não é contínuo, havendo orifícios na sua parede, o que permite a livre passagem de macromoléculas do interior do sinusóide para o espaço de Disse e daí para as células hepáticas. Assim, os hepatócitos têm livre acesso às substâncias que circulam nos sinusóides. Nos sinusóides, desembocam ramos capilares terminais da artéria hepática que trazem oxigênio para o parênquima hepático. No centro do lóbulo, observa-se uma veia, a **veia centrolobular**, onde desembocam os capilares sinusóides (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

2.6 NECROSE HEPÁTICA

As células hepáticas estão expostas a freqüentes alterações bioquímicas ou morfológicas, pois recebem em primeira mão, substâncias da absorção intestinal (COÊLHO, 1971). A necrose hepatocelular, morte do hepatócito, é achado freqüente e marcador fundamental de hepatopatias agudas ou crônicas. É de fundamental importância sua localização zonal, extensão e duração, definindo assim padrões diagnósticos de doenças hepáticas. Na necrose focal há destruição de hepatócitos isolados ou em pequenos agrupamentos. Devido ao rápido desaparecimento das células hepáticas, a necrose focal é identificada pela presença de agregados linfomononucleares bem delimitados em meio aos quais são vistos ou não,

restos celulares. Este tipo de necrose geralmente isolada e esparsa compreende preservação do restante dos hepatócitos, como na hepatite crônica persistente. As necroses focais podem atingir por vezes proporções avantajadas em condições como a febre tifóide e formas graves de hepatite reativa não-específica. Na necrose lobular maciça, a destruição hepatocelular acomete lóbulos inteiros, levando ao colapso do arcabouço reticular e à aproximação de tratos portais vizinhos. A necrose submaciça é um padrão de necrose que poupa áreas do lóbulo hepático, levando, entretanto, à confluência de zonas de necrose com colapso conseqüente do arcabouço reticular e formação de pontes que unem estruturas vasculares adjacentes entre si. Em tais pontes, a depender da gravidade do processo, podem se depor vários tipos de colágeno formando septos que contêm anastomoses portossistêmicas intra-hepáticas e que podem, na evolução do processo, delimitar áreas de regeneração com padrão nodular, constituindo-se terreno propício para o desenvolvimento da cirrose hepática (GAYOTTO & ALVES, 1995).

As lesões hepáticas, principalmente em níveis histopatológicos, têm sido relatadas em várias espécies. Na maior parte das espécies as lesões apresentam acúmulo de lipofuscina ou pigmento ceróide. A lipofuscina é um lipopigmento endógeno, não derivado da hemoglobina, que se acumula nas fibras do miocárdio e células hepáticas nas doenças degenerativas e de senescência. No coração e fígado, o pigmento causa mudança de cor descrita como atrofia parda, que produz diminuição global da víscera, manifestando atrofia celular difusa. Macroscopicamente, o fígado apresenta cor parda escura, contraído e diminuído de peso (ROBBINS, 1986). A presença de lipofuscina é altamente característica na deficiência

de vitamina E, sendo reconhecida por ser proveniente da autooxidação *in vivo* dos ácidos graxos polinsaturados (DAM & GRANADOS, 1945 citados por PIKE & BROWN, 1984).

Segundo SCHWARTZ (1954), certas dietas pobres em proteínas, especialmente em aminoácidos sulfurados (cistina, em particular), segundo se verificou, produzem uma necrose hepática maciça, aguda, nos animais em experimentação. A deficiência de vitamina E aumenta os efeitos necróticos das dietas, ao passo que a adição da vitamina E exerce ação preventiva da necrose. Os ratos mantidos com dieta deficiente desenvolvem a lesão hepática fatal subitamente (dentro de poucas horas ou dias), depois de um período latente assintomático que dura, em média, 45 dias. Segundo FITE (1954), o fígado pode parecer normal no 33º dia e necrótico no 34º.

A ação protetora da cistina contra a degeneração hepática foi descoberta por WEICHSELBAUM em 1935, e confirmada por DAFT e colaboradores em 1942, e HOCK e FINK em 1943. Além da cistina, outro agente de proteção já citado, é a vitamina E, que foi elucidado entre 1941 e 1944 por SCHWARZ e confirmadas por GYORGY e colaboradores em 1947 (SCHWARZ, 1954).

SCHWARZ (1951) testou o efeito protetor da vitamina E e da L-cistina contra necrose hepática em animais submetidos a dietas depletadas nessas substâncias. Ele utilizou 152 animais submetidos à dieta necrogênica; destes, 145 morreram de necrose hepática, sendo que o primeiro animal morreu no 22º dia e o último no 83º dia, sendo que a média

de sobrevivência dos animais foi de 45 dias. A suplementação de L-cistina foi testada em diferentes concentrações, e seu efeito protetor foi aumentando à medida que a concentração foi sendo aumentada, até uma completa proteção, conseguida com 1% de L-cistina na dieta. Quanto à vitamina E, seu efeito protetor também foi testado em concentrações gradativas, e esta teve seu efeito completo com 5mg de acetato de α -tocoferol por dia (SCHWARZ, 1951).

HOFFBAUER & WITTEMBURG (1954) realizaram estudo com 31 ratos submetidos à dieta necrogênica. Estes animais tiveram suas urinas coletadas a partir do 20º dia experimental, para análise da presença de bilirrubina, que foi utilizada como marcador da presença de necrose hepática. A medida que a bilirrubina foi aparecendo, os animais passaram a ser suplementados com tocoferol intramuscular (12,5mg) e adicionado à dieta (1mg). Dos 31 animais, 14 não apresentaram bilirrubina na urina, assim não receberam suplementação, apresentando necrose massiva fatal entre 28º e o 58º dia. Quatro animais que iniciaram suplementação após ser constatada a presença de bilirrubina na urina, entre o 33º e o 40º dia, morreram após 48 horas do início da suplementação, apresentando necrose massiva. Os 13 animais restantes, também suplementados com tocoferol após a constatação da presença de bilirrubina na urina, entre o 30º e o 46º dia, foram sacrificados no 163º dia, destes, 12 animais apresentaram cicatrizes pós-necróticas. Estas cicatrizes apresentaram-se mais proeminentes na superfície do lado esquerdo do lobo lateral. Estes mesmos autores utilizaram suplementação de cistina (20mg de cistina para 8g de dieta/dia) após a presença de bilirrubina na urina dos ratos submetidos à dieta necrogênica. Foram utilizados 25 animais, dos quais 12

não apresentaram bilirrubina na urina, morrendo sem suplementação, com presença de necrose massiva entre os dias 42° e 60°; 5 animais que receberam suplementação após a bilirrubina positiva, morreram com necrose entre os dias 4 e 96 após o início da suplementação. Os 8 animais restantes foram sacrificados no 162° dia, destes, 7 apresentavam cicatrizes pós-necróticas e entre eles, 3 apresentavam sinais de necrose hemorrágica. As áreas de necrose foram mais observadas nas margens livres dos lobos, nas áreas de contato com outras vísceras e nos lobos menos espessos (FITE, 1954).

Após estes trabalhos realizados na década de 50, somente se pôde ter às mãos uma menção feita por HARPER *et alii* (1982).

2.7 PEROXIDAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

Os efeitos tóxicos do oxigênio sobre os seres vivos já eram conhecidos no final do século XIX, quando foram descritas alterações no tecido pulmonar após exposição a altas tensões do gás (LORRAIN-SMITH, 1899 citado por LIMA *et alii*, 2002). Estes efeitos tóxicos são resultado da oxidação de componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídios, principalmente ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), por ação de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, conhecidas como Radicais Livres (RL) (MENEHINI, 1987).

Os RL são formados durante processos biológicos normais e patológicos, podendo causar danos às células e aos tecidos. Um RL é

qualquer espécie capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (GUTTERIDGE & HALLIWEL, 1994). As espécies reativas do oxigênio incluem todos os radicais do oxigênio, como o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila (OH^{\bullet}) e peroxila (RO_2^{\bullet}). O ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2) e ozônio (O_3), são espécies não radicalares, mas podem facilmente levar a reações mediadas por radicais livres nos organismos vivos. Nas espécies reativas do nitrogênio estão incluídos, além do peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), o óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) e o radical dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet}). Os radicais livres estão relacionados com várias doenças, incluindo câncer, doenças hepáticas, aterosclerose e envelhecimento. Na maioria das vezes esta relação se dá pela propriedade que os RL tem de reagir com ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), servindo como iniciadores do processo de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) (MENEHINI, 1987).

A lipoperoxidação pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação do RL sobre os lípidos das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca metabólica e, numa condição extrema à morte celular (BENZIE, 1996). Basicamente, a LPO é a incorporação de um oxigênio molecular em um AGPI para produzir hidroperóxidos como produto primário inicial. Nos sistemas biológicos, a LPO pode ocorrer por duas vias: uma enzimática, envolvendo as ciclooxigenases e lipoxigenases e a peroxidação não enzimática (autoxidação) que envolve a participação de espécies reativas de oxigênio, metais e outros radicais livres (AL MEHDI *et alii*, 1993).

O processo da LPO pode ser dividido em etapas: iniciação, propagação, re-iniciação (*in vivo*) e terminação, como mostra a Figura 2. A fase de iniciação representa o início da peroxidação, onde uma espécie radical $R\bullet$ pode abstrair um hidrogênio atômico de um substrato lipídico (LH) resultando na formação de uma espécie alquila ($L\bullet$). A segunda etapa, a propagação ocorre entre o radical alquila ($L\bullet$) formado e um oxigênio (O_2), formando um radical lipídico peroxila ($LOO\bullet$). Este radical peroxila pode reagir com outro substrato lipídico (LH), formando um novo radical alquila ($L\bullet$) e um hidroperóxido ($LOOH$). Já a fase de re-iniciação, ocorre quando um hidroperóxido ($LOOH$), na presença de metais de transição, como o ferro (Fe^{2+}), reage formando um radical alcóxila ($LO\bullet$) ou na presença de metais de transição oxidados (Fe^{3+}), formando um radical peroxila ($LOO\bullet$). As duas espécies radicais formadas, $LO\bullet$ e $LOO\bullet$, podem re-iniciar a peroxidação lipídica pela interação com outros substratos lipídicos, formando novas espécies alquilas ($L\bullet$). A última etapa da reação, a terminação, pode ocorrer através da interação entre dois radicais peroxila ($LOO\bullet$), formando produtos estáveis, ou através da reação entre um radical peroxila ($LOO\bullet$) e um inibidor (IH), formando um novo hidroperóxido ($LOOH$) e um radical inibidor estável (KRINSKI, 1988).

FIGURA 2

Antioxidantes são substâncias que retardam ou inibem danos oxidativos às moléculas alvo, dentre as mais importantes estão a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase, a vitamina E e a vitamina C. Todas as células presentes nos organismos vivos são potencialmente alvos para o dano oxidativo. A ação dos antioxidantes sobre essas moléculas pode acontecer de várias formas: 1) capturando espécies derivadas do oxigênio, utilizando enzimas catalíticas ou por reações químicas diretas; 2) minimizando a formação de espécies derivadas do oxigênio; 3) quelando íons metálicos necessários para converter espécies menos reativas (como $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2) em espécies com reatividade maior (como OH^{\bullet}); 4) reparando danos causados aos alvos; 5) destruindo moléculas alvo muito danificadas por novas moléculas. Os tocoferóis (vitamina E) inibem a peroxidação lipídica por serem captadores de radicais lipídicos peroxila, fazendo isso de forma mais rápida do que os radicais peroxila possam reagir com as cadeias laterais de ácidos graxos adjacentes ou com proteínas de membranas. Como é possível visualizar na Figura 3, o grupo -OH do α -tocoferol doa seu átomo de hidrogênio ao radical peroxila (LOO^{\bullet}), formando um radical α -tocoferila ($\alpha-T^{\bullet}$) e um hidroperóxido. Em uma segunda reação, o radical α -tocoferila ($\alpha-T^{\bullet}$) reage com outro radical peroxil (LOO^{\bullet}) formando um produto estável. Portanto, o α -tocoferol é um antioxidante “chain breaking”, ele quebra a reação de cadeia da peroxidação lipídica, sendo ele mesmo convertido a um radical durante o processo em que a vitamina E é utilizada (PORTER *et alii*, 1995; GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1994).

FIGURA 3

Aldeídos são formados sempre que hidroperóxidos são metabolizados em sistemas biológicos e a identificação e quantificação destes compostos dá um índice indireto do dano oxidativo resultante da peroxidação lipídica. O dialdeídomalônico é o mais abundante aldeído formado durante a peroxidação lipídica e sua determinação é feita pela medição da intensidade da cor de produtos formados pela reação com ácido tiobarbitúrico (TBA). Este método é um dos mais utilizados em estudos de peroxidação lipídica. Neste teste, uma molécula de dialdeídomalônico reage com duas moléculas de TBA produzindo um pigmento rosa, que é detectado em absorbância máxima entre 532 e 535nm (BROWN & KELLY, 1996).

4 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Fontes Protéicas

Utilizou-se feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) cultivar IAC-Carioca (anteriormente denominado Carioca 80 e Carioca 80 SH), proveniente do Centro de Produção de Material Propagativo do Instituto Agrônomo de Campinas, SP. O feijão foi previamente macerado em água 1:3 e cozido em panela de pressão doméstica com a água de maceração, por 40 minutos após a exaustão do ar e formação de fluxo contínuo de vapor, congelado em freezer doméstico (temperatura -20°C) e posteriormente liofilizado, sendo então moído (30 mesh) para realização das análises e formulações das dietas experimentais.

3.1.2 Animais para experimentação

Foram utilizados 40 ratos albinos machos da linhagem Wistar, recém-desmamados (21 dias), proveniente do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB), SP.

3.1.3 Fontes de vitamina E

- Destilado da Desodorização do Óleo de Soja (DDOS), proveniente de Granol Indústria e Comércio S.A.

- EPHINAL[®] (Acetato de DL- α -tocoferol), proveniente de Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Determinações químicas

3.2.1.1 Composição centesimal

3.2.1.1.1 Proteína Bruta

O nitrogênio foi determinado no feijão cozido e liofilizado e nas dietas prontas por método semi-micro Kjeldahl (AOAC, 1975) utilizando-se 5,4 como fator de conversão de nitrogênio para proteína no feijão (MOSSÉ, 1990).

3.2.1.1.2 Lipídeos Totais

Foram extraídos e determinados segundo o método de BLIGH & DYER (1959), utilizando como solventes, clorofórmio, metanol e água.

3.2.1.1.3 Fibra Bruta

A fibra bruta foi determinada segundo método de Scharrer e Kürschner, descrito por ANGELUCCI *et alii* (1987), utilizando ácido nítrico, ácido tricloroacético e ácido acético para hidrólise.

3.2.1.1.4 Umidade

A determinação da umidade foi realizada por gravimetria, utilizando estufa a 105°C até peso constante (PEARSON, 1976).

3.2.1.1.5 Cinzas

Foram determinadas por incineração a 550°C em forno mufla (LEES, 1979), obtendo-se o resíduo mineral fixo.

3.2.1.1.6 Carboidratos

Determinados por diferença, utilizando a fórmula: $100 - (\text{proteínas} + \text{lipídeos} + \text{fibra bruta} + \text{cinzas} + \text{umidade})$.

3.2.1.2 Determinação do aminograma do feijão-comum

A determinação do aminograma foi feita por hidrólise ácida em aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), modelo PCX 3100, Pickering Laboratories, com separação de troca iônica e reação pós-coluna com ninidrina, segundo a metodologia descrita por SPACKMAN *et alii* (1958).

3.2.1.3 Determinação de vitamina E

A vitamina E foi determinada pelo método descrito por CONTRERAS-GUZMÁN & STRONG III (1982), através de método espectrofotométrico após reação com íons cúpricos e complexação dos íons cuprosos com 2,2'biquinolina (cuproína).

3.2.1.4 Determinação de bilirrubina na urina

Determinada por meio de “kit” para análise de urina proveniente de TECO DIAGNOSTICS (não era especificada na bula nem os reagentes, nem o princípio do método).

3.2.1.5 Determinação da oxidação de lípidos hepáticos

Foi utilizado o método descrito por SINNHUBER & YU (1958) o qual baseia-se na determinação de produtos da degradação secundária da oxidação de lípidos pela reação com ácido 2-tiobarbitúrico (TBA); o método mede a intensidade da cor desenvolvida a 535nm, quando o material contendo lípidos insaturados oxidados, é colocado em reação com o ácido 2- tiobarbitúrico em meio ácido; a intensidade da cor é uma medida da formação de um pigmento vermelho composto por 2 moléculas de TBA e 1 de malonaldeído, que é um produto da degradação secundária da autoxidação de lípidos.

3.2.2 Exame histológico

O exame foi realizado em fragmentos de fígado fresco, mais especificamente do lobo esquerdo, que foram fixados em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M, por 48 horas, seguido de desidratação em série crescente de álcool etílico até álcool absoluto, clarificação em xilol, empregnação em parafina/xilol com inclusão e emblocagem a 58°C em “Paraplast plus” (mistura de parafina, polímeros plásticos e dimetil-sulfóxido). Os blocos foram cortados em espessura de 5µm em micrótomo rotatório manual JUNG AG, modelo 1130, e cerca de 3 cortes foram colocados em cada lâmina. Após foi realizada desparafinização com xilol, hidratação e coloração com Hematoxilina/Eosina (HE), segundo metodologia descrita por BEHMER *et alii* (1976), e as lâminas foram fotografadas no microscópio NIKON ECLIPSE modelo E800 com filme Kodak Gold colorido de 100 asas.

3.2.3 Ensaio Biológico

3.2.3.1 Dietas experimentais e tratamento

As dietas experimentais foram elaboradas segundo o “American Institute of Nutrition” (REEVES *et alii*, 1993) seguindo a formulação da dieta AIN-93G, à exceção do teor de proteína que foi utilizado 12% (GOENA *et alii*, 1989; SANTIDRIÁN *et alii*, 1988; PELLET & YOUNG, 1980) e da fonte protéica que foi utilizado feijão comum cozido e liofilizado. As dietas foram

preparadas de forma a se apresentarem isoprotéicas ($12,4\pm 0,6$) e isocalóricas (394,8 Kcal/100g de dieta).

Os animais foram divididos em 5 grupos: 4 grupos contendo 7 animais cada, e um grupo que era formado por 12 animais para dissecação do fígado em tempos intermediários. Os grupos corresponderam aos seguintes tratamentos:

- **Grupo CO (Controle):** dieta AIN-93G com teor de proteína de 12% e fonte protéica feijão-comum, cozido e liofilizado.
- **Grupo DE:** dieta AIN-93G com teor de proteína de 12% e fonte protéica feijão-comum cozido e liofilizado, porém depletada em vitamina E e cistina.
- **Grupo EP:** dieta AIN-93G com teor de proteína de 12%, fonte protéica feijão-comum cozido e liofilizado, depletada em vitamina E e cistina, e com suplementação de vitamina E pelo método de gavagem através do fármaco EPHINAL[®] (0,5mL) em quantidade equivalente a 50 mg/dia de vitamina E por rato.
- **Grupo DD:** dieta AIN-93G com teor de proteína de 12%, fonte protéica feijão-comum cozido e liofilizado, depletada em vitamina E e cistina, e com suplementação de vitamina E pelo método de gavagem através do Destilado da Desodorização do Óleo de Soja – DDOS (0,5mL), em quantidade equivalente a 50mg/dia de vitamina E por rato.

- **Grupo AP (aprotéico):** dieta AIN-93G com sua quantidade de proteína substituída proporcionalmente por amido, amido dextrinizado e sacarose.

As formulações das dietas utilizadas, misturas mineral e vitamínica estão descritas nas Tabelas 1, 2 e 3. Dietas e água foram oferecidas à vontade.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais utilizadas no ensaio biológico.

Ingredientes (g/Kg de dieta)	Dietas		
	Controle*	Depletada**	Aprotéica***
Feijão-comum	659,3	659,3	-
Amido de milho	135,1	135,1	524,1
Amido dextrinizado	44,7	44,7	173,8
Sacarose	33,9	33,9	131,6
Óleo de soja	70,0	70,0	70,0
Fibra (celulose)	6,5	6,5	50,0
L-cistina	3,0	-	3,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5
Tetrabutylhidroquinona	0,014	0,014	0,014
Mistura Mineral ¹	35,0	35,0	35,0
Mistura Vitamínica ¹	10,0	-	10,0
Mistura Vitamínica sem vit.E ¹	-	10,0	-

* Dieta com fonte protéica feijão-comum (12%)

** Dieta com fonte protéica feijão-comum (12%) e depletada de L-cistina e vitamina E

*** Dieta Aprotéica, em que o teor de proteína foi substituído por amido, amido dextrinizado e sacarose

¹ Misturas Mineral e Vitamínica estão descritas nas Tabelas 2 e 3

Tabela 2. Mistura mineral segundo a formulação da AIN-93G, utilizada nas dietas experimentais.

Minerais	Quantidades (g/Kg de mix)
Carbonato de Cálcio	357,00
Fosfato de Potássio	196,00
Citrato de Potássio Tribásico	70,78
Cloreto de Sódio	74,00
Sulfato de Potássio	46,60
Óxido de Magnésio	24,00
Citrato Férrico	6,06
Carbonato de Zinco	1,65
Carbonato de Manganês	0,63
Carbonato Cúprico	0,30
Iodeto de Potássio	0,01
Selenato de Sódio	0,01025
Paramolibdato de Amônio	0,00795
Metassilicato de Sódio	1,45
Sulfato de Potássio e Cromo	0,275
Cloreto de Lítio	0,0174
Ácido Bórico	0,0815
Fluoreto de Sódio	0,0635
Carbonato de Níquel	0,0318
Vanadato de Amônio	0,0066

Tabela 3. Mix vitamínico segundo a formulação da AIN-93G, utilizado nas dietas experimentais.

Vitaminas	Quantidades (g/Kg dieta)	
	Mix vitamínico com vit. E*	Mix vitamínico sem vit.E
Ácido Nicotínico	30mg/Kg	30mg/Kg
Pantotenato	15mg/Kg	15mg/Kg
Piridoxina	6mg/Kg	6mg/Kg
Tiamina	5mg/kg	5mg/kg
Riboflavina	6mg/Kg	6mg/Kg
Ácido Fólico	2mg/Kg	2mg/Kg
Vitamina K	750µg/Kg	750µg/Kg
D-biotina	200µg/Kg	200µg/Kg
Vitamina B ₁₂	25µg/Kg	25µg/Kg
Vitamina A	4000UI/Kg	4000UI/Kg
Vitamina E	75UI/Kg	-

* Mix vitamínico segundo a formulação da AIN-93G

3.2.3.2 Procedimento experimental

O ensaio biológico foi realizado no Laboratório de Ensaio Biológicos do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição (DEPAN) da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, onde os animais permaneceram em gaiolas metabólicas individuais, recebendo dieta e água à vontade. As condições ambientais do laboratório eram de 22±2°C de temperatura, umidade relativa de 50-60% e ciclo de claro e escuro de 12 horas. O projeto desta dissertação foi aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (protocolo nº 167-1).

O ensaio biológico teve duração de 65 dias, dos quais 8 dias foram utilizados para aclimação dos animais ao ambiente e crescimento. Neste período os animais receberam dieta não purificada de fórmula fechada Nuvilab CR-1 autoclavável da NUVITAL Nutrientes Ltda. Durante os 57 dias seguintes, foi realizado o experimento propriamente dito, onde nos primeiros 4 dias, os animais passaram pela adaptação às dietas experimentais e às suplementações. Durante o período experimental foram calculadas a Digestibilidade Aparente e Corrigida pela Dieta Aprotéica das proteínas dietéticas, assim como o Quociente de Eficiência Protéica (PER) e o Quociente de Conversão Alimentar (QCA). Os animais tiveram acompanhamento de evolução ponderal e de consumo de dieta a cada 4 dias.

Nos tempos 0, lembrando que o tempo 0 foi contado do início da adaptação, 7, 14 e 21, a bilirrubina urinária foi monitorada, e a partir do 21º dia, a monitoração passou a ser feita num intervalo de 3 dias até o final do experimento.

No 33º e 40º dia, foram sacrificados 2 animais par a dissecação dos fígados e observação anatômica, e o restante dos animais tiveram seus fígados dissecados no final do experimento para realização dos exames histológicos e do valor TBA.

3.3 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA e teste de confronto de médias – teste de Tukey, utilizando o “software” estatístico “The SAS system” versão 6.10, considerando $p < 0,05$ como probabilidade mínima aceitável para diferença entre as médias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinações Químicas

4.1.1 Composição Centesimal

As análises da composição centesimal do feijão-comum foram realizadas no mínimo em triplicata e os resultados estão demonstrados na Tabela 4, estando de acordo com outros autores (OLIVEIRA *et alii*, 2001; MENDÉZ *et alii*, 1993; SGARBIERI, 1989).

Tabela 4. Composição centesimal do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) cultivar IAC-Carioca cozido e liofilizado, utilizado como fonte protéica nas dietas experimentais.

Componente	Porcentagem*
Proteínas	18,25±0,23
Lipídeos	2,45±0,05
Fibra bruta	6,61±0,27
Umidade	2,83±0,12
Cinzas	3,54±0,02
Carboidratos**	66,36
Sólidos totais	97,16±0,15

* Os resultados representam a média±desvio-padrão (n=3)

** Determinados por diferença

4.1.2 Aminograma do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) cultivar IAC-Carioca

Os resultados obtidos na análise do aminograma do feijão-comum cozido e liofilizado estão demonstrados na Tabela 5, estando de acordo com OLIVEIRA (1986) que encontrou para a metionina 1,0g/16gN e para a cistina 0,3g/16gN, tendo trabalhado com o mesmo cultivar de feijão utilizado neste trabalho.

A recomendação de aminoácidos sulfurados segundo a Food and Nutritional Board (1975) é de 2,6%. Foi encontrado no feijão, um total de aminoácidos sulfurados de 1,17%, tornando este, uma fonte protéica deficiente nestes aminoácidos, mais ainda levando-se em conta a biodisponibilidade de metionina de 57% apresentada por TEZOTO & SGARBIERI (1990), que estendendo-se para a cistina, torna o cultivar uma fonte protéica perfeita a ser utilizada.

Tabela 5. Composição de aminoácidos do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) cultivar IAC-Carioca utilizado no experimento e padrão aminoacídico para proteínas de alta qualidade, preconizada pela “Food and Nutrition Board”, USA, 1975.

Aminoácidos	%	Padrão aminoacídico* (%)
Ácido aspártico	12,75	
Treonina	4,18	3,5
Serina	5,83	
Ácido glutâmico	16,08	
Prolina	8,19	
Glicina	4,24	
Alanina	4,59	
Valina	5,13	4,8
Cistina	0,47	
Metionina	0,70	
Aminoácidos sulfurados**	1,17	2,6
Isoleucina	4,06	4,2
Leucina	8,01	7,0
Tirosina	2,53	
Fenilalanina	5,54	
Aminoácidos aromáticos***	8,07	7,3
Lisina	6,77	5,1
Amônia	1,77	
Histidina	2,59	1,7
Arginina	6,65	

* FOOD AND NUTRITIONAL BOARD (1975)

** cistina + metionina

*** tirosina + fenilalanina

4.1.3 Determinação de vitamina E

O valor médio encontrado na determinação de vitamina E presente no Destilado da Desodorização do Óleo de Soja (DDOS) foi $11,4 \pm 0,65$ g de tocoferóis totais por 100g de amostra, estando de acordo com os valores encontrados por ALMEIDA (2000) e AUGUSTO (1988), 9,5-11,2% e 8,5-12,4% respectivamente. Já para o Ephinal[®] considerou-se a quantidade indicada pela empresa fornecedora do mesmo, 400mg de DL- α -tocoferol por cápsula.

4.1.4 Determinação de Bilirrubina na urina

A determinação da bilirrubina na urina dos animais experimentais foi realizada nos tempos 0, 7, 14, 21 e a partir deste último, a cada 3 dias até o final do experimento seguindo-se a referência de SCHWARZ (1954) que utiliza a bilirrubina como um marcador da presença de necrose no fígado, porém, não foi detectada em nenhum dos tempos a presença de bilirrubina na urina dos animais.

4.1.5 Determinação da oxidação dos lípides hepáticos

A necrose hepática esperada como resultado a ser observado nos animais submetidos à dieta depletada em cistina e vitamina E,

visivelmente não foi observada, assim sendo, determinou-se a oxidação dos lípides do fígado, especulando-se uma possível alteração não visível no órgão. Os resultados da oxidação do fígado liofilizado, calculados através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados das determinações de TBA nos fígados liofilizados dos animais submetidos aos seguintes tratamentos: CO: dieta controle - AIN-93G na forma íntegra com fonte protéica feijão-comum a 12%; DE: dieta AIN-93G com fonte protéica feijão-comum a 12% e depletada de cistina e vitamina E; EP: dieta AIN-93G com fonte protéica feijão-comum a 12% e depletada de cistina e vitamina E e suplementada com EPHINAL®; DD: dieta AIN-93G com fonte protéica feijão-comum a 12% e depletada de cistina e vitamina E e suplementada com DDOS.

DIETA	TBA (mg dialdeídomalônico/Kg de amostra)*
CO	25,7±5,4 ^b
DE	46,2±10,3 ^a
EP	24,3±3,9 ^b
DD	34,4±11,5 ^b

* Os resultados representam a média±desvio-padrão (n=7)
^{a, b, c, d} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05)

Observando a tabela acima, não houve diferença significativa entre os grupos controle (CO), suplementado com Ephinal® (EP) e suplementado com DDOS (DD), embora o valor encontrado para o grupo DD tenha sido maior, o que mais uma vez sugere-se ser devido

à presença de substâncias químicas já comentadas que podem estar comprometendo a atividade plena da vitamina E presente no DDOS. Já o grupo que recebeu dieta depletada em vitamina E e cistina apresentou o maior valor de TBA, com diferença significativa entre os demais grupos, o que está de acordo com estudos feitos por CHIARELLO *et alii* (1998), que utilizou a análise de TBARS para quantificar a oxidação dos lípides hepáticos em ratos submetidos à dietas deficiente em vitamina E e suplementada com vitamina E, tendo como resultado um maior valor de TBARS para a dieta com quantidade deficiente de vitamina E, conferindo assim a ação protetora desta vitamina à oxidação lipídica.

4.2 Exame histológico

Conforme descrito anteriormente, foram retiradas amostras do lobo esquerdo do fígado dos ratos no início do experimento (T0), no quadragésimo dia de experimento (T40) e no quinquagésimo sétimo dia, tempo final do experimento (T57). Considerando-se a constituição histológica normal do fígado, as fotomicrografias apresentadas em seqüência (Figuras 2 a 11) apresentaram lóbulos hepáticos normais, a disposição dos hepatócitos em traves, não sendo observado em nenhum caso acúmulo de tecido conjuntivo, indicando fibrose, e nem mesmo a presença de células necróticas em nenhuma das situações estudadas.

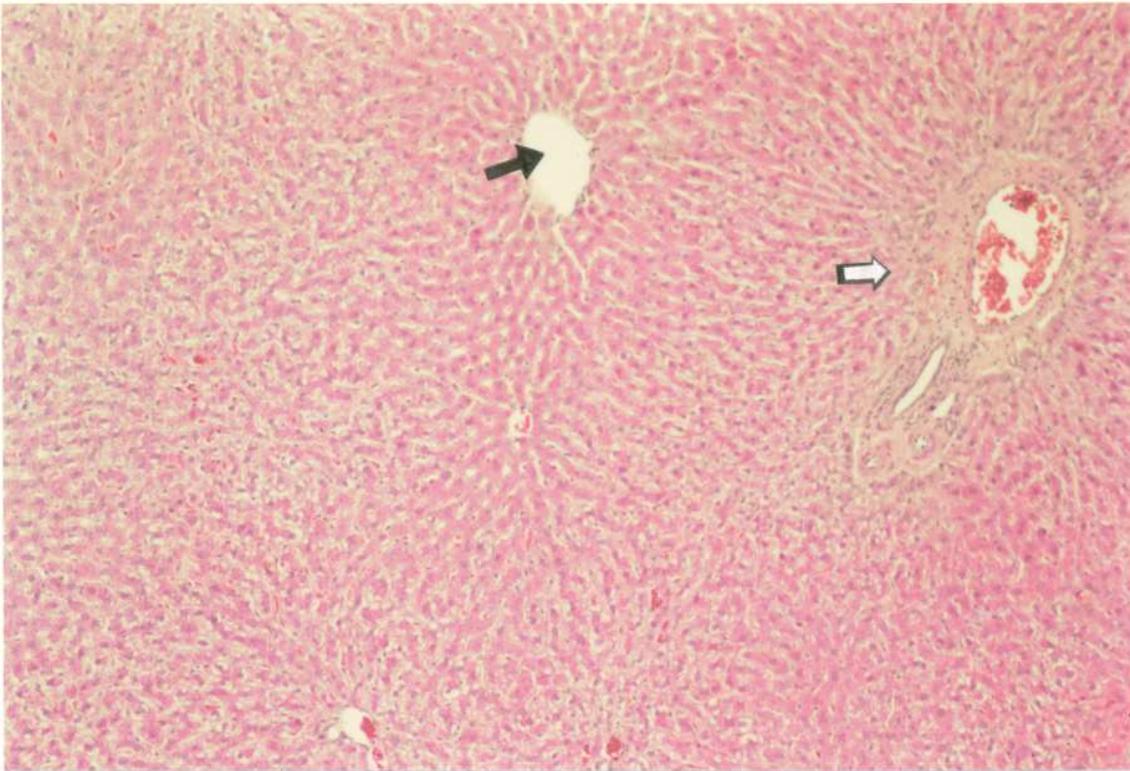


FIGURA 4 – Fotomicrografia de fígado (Grupo Controle), tempo final (57 dias), mostrando parte de um lóbulo hepático com veia centro lobular (seta) e espaço porta (seta vazada). HE. 90X.

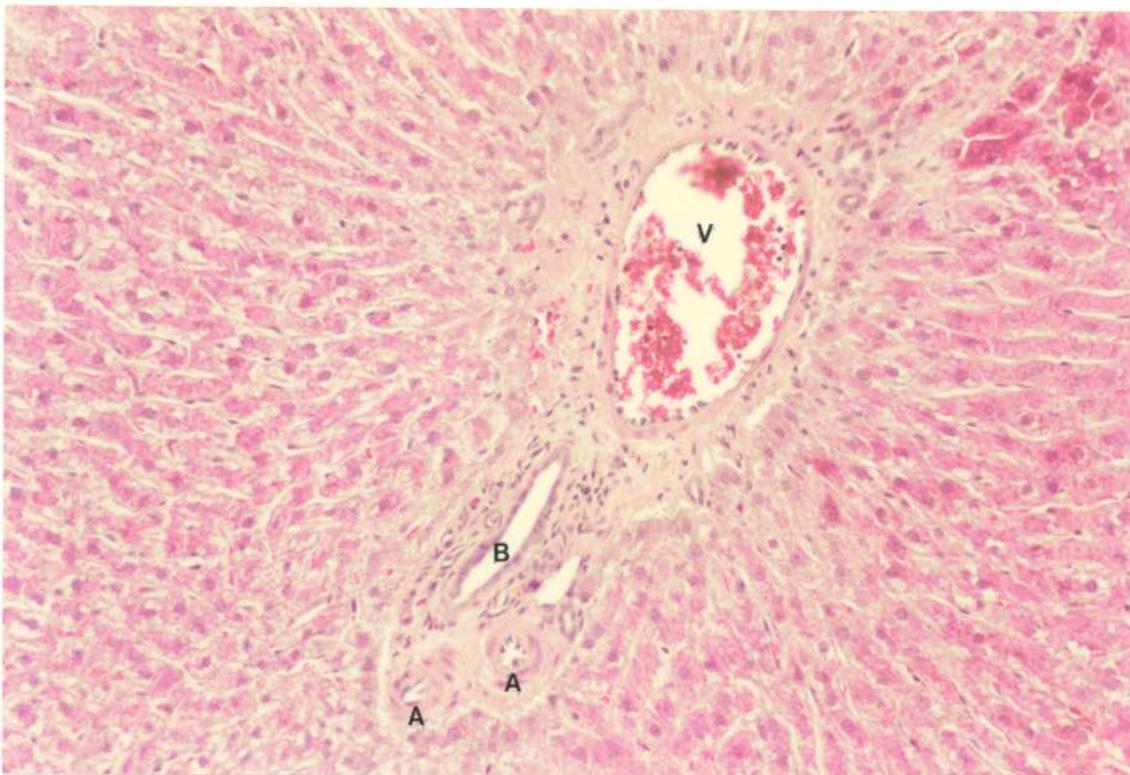


FIGURA 5 – Detalhe da figura anterior mostrando um espaço porta com todos seus elementos, vênulas (V), arteríolas (A) e ducto biliar (B). Além disso, observa-se as traves de hepatócitos. HE. 180X.

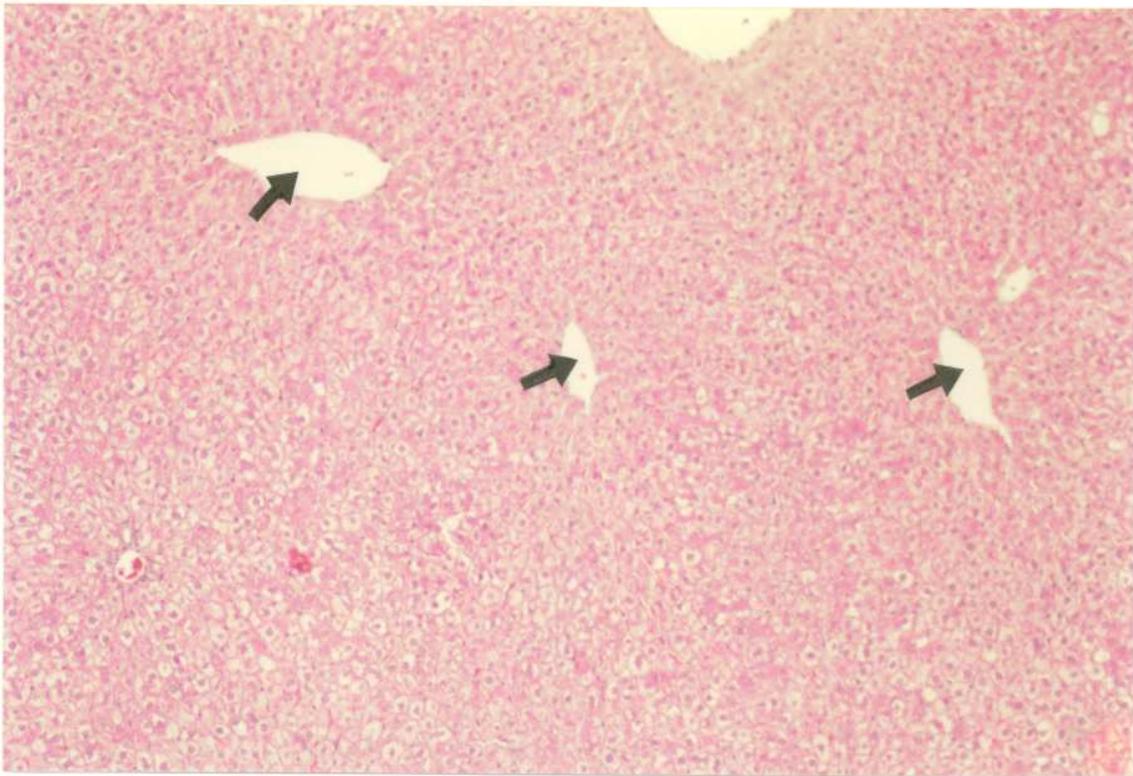


FIGURA 6 – Fotomicrografia de fígado (Grupo EP), tempo final (57 dias), mostrando parênquima hepático com veias centro lobulares (setas) em detalhe. HE. 90X.

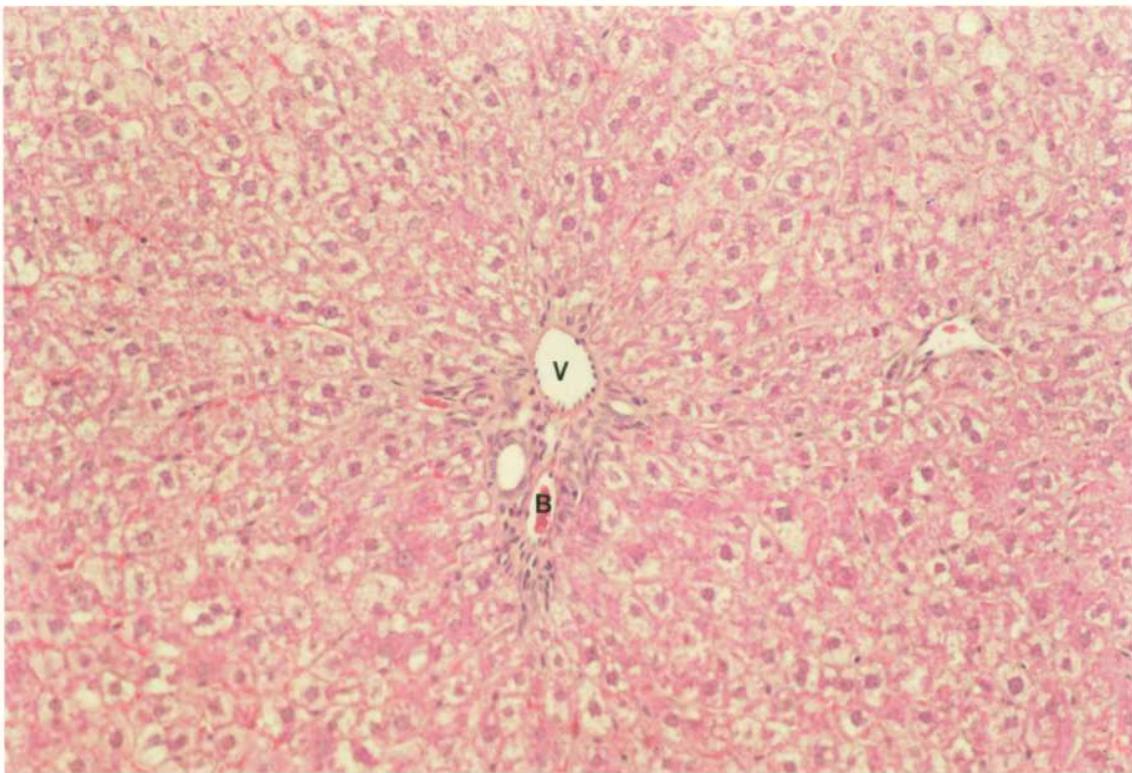


FIGURA 7 – Fotomicrografia de fígado (Grupo EP), tempo final (57 dias), mostrando espaço porta com seus elementos, vênula (V), ductos biliares (B) e traves de hepatócitos. HE. 180X

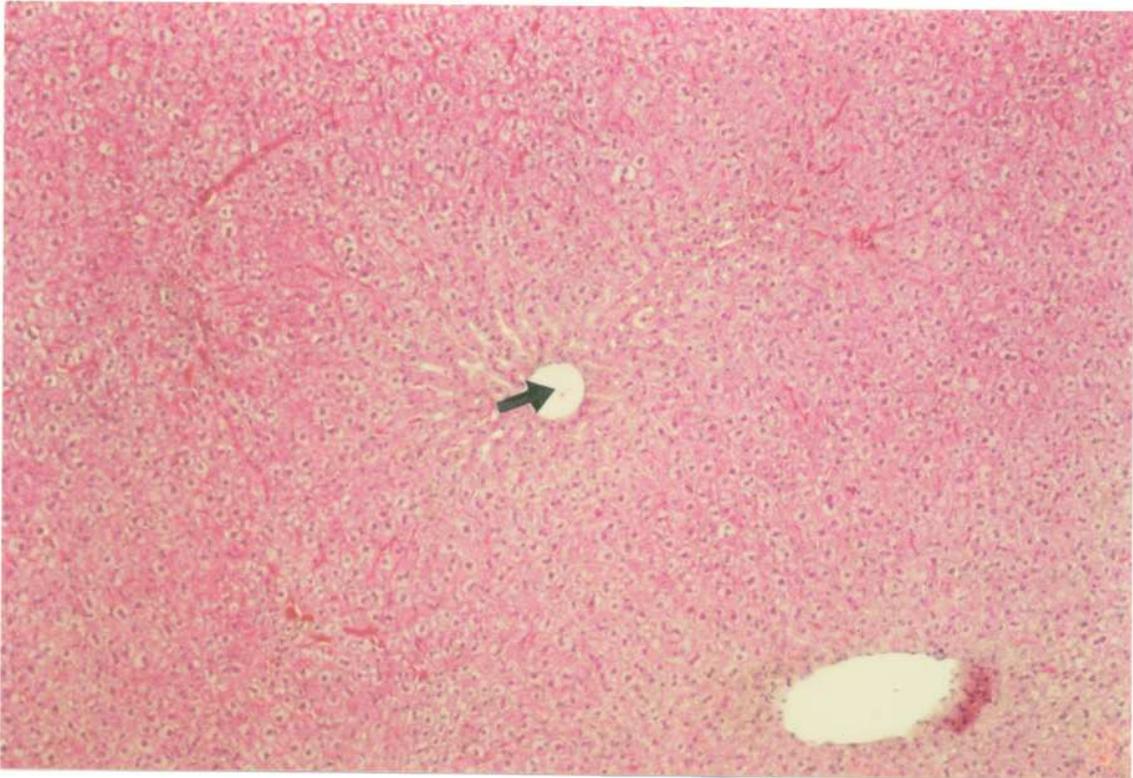


FIGURA 8 – Fotomicrografia de fígado (Grupo DD), tempo final (57 dias), mostrando parênquima hepático com veia centro lobular (setas). HE. 90X.

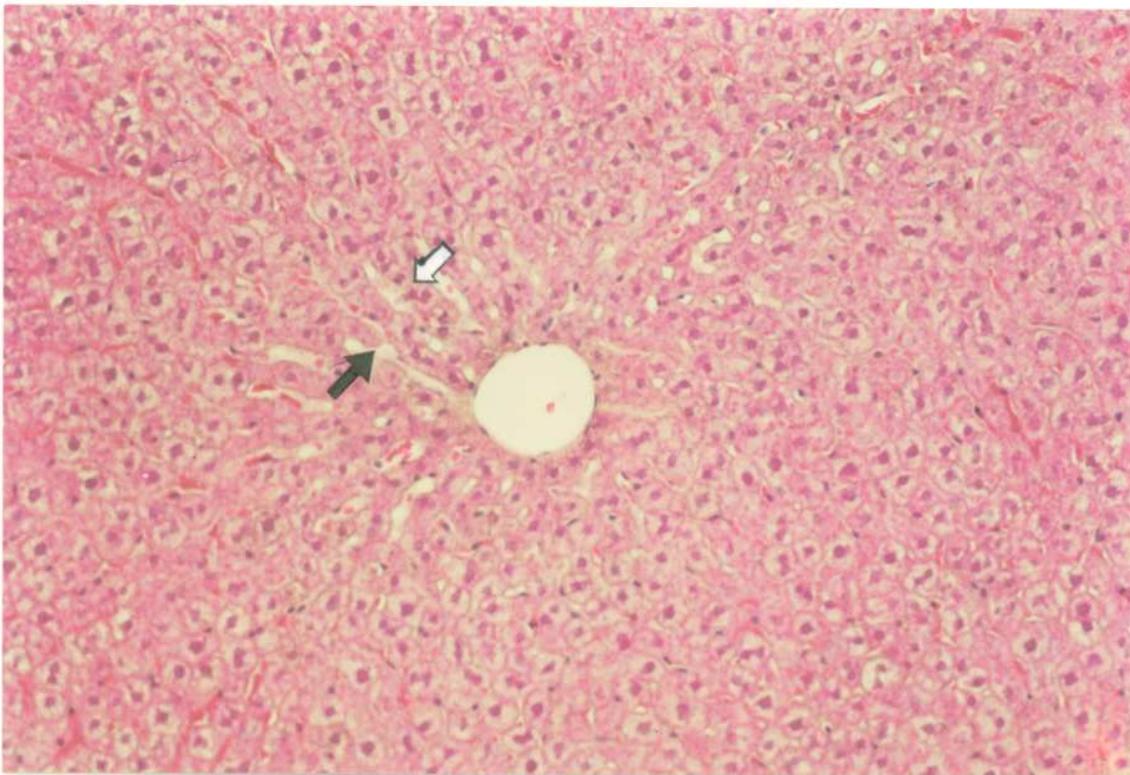


FIGURA 9 – Detalhe da figura anterior. Notar a veia centro lobular e as traveses de hepatócitos (setas vazadas) entremeados por sinusóides hepáticos (seta). HE. 180X.

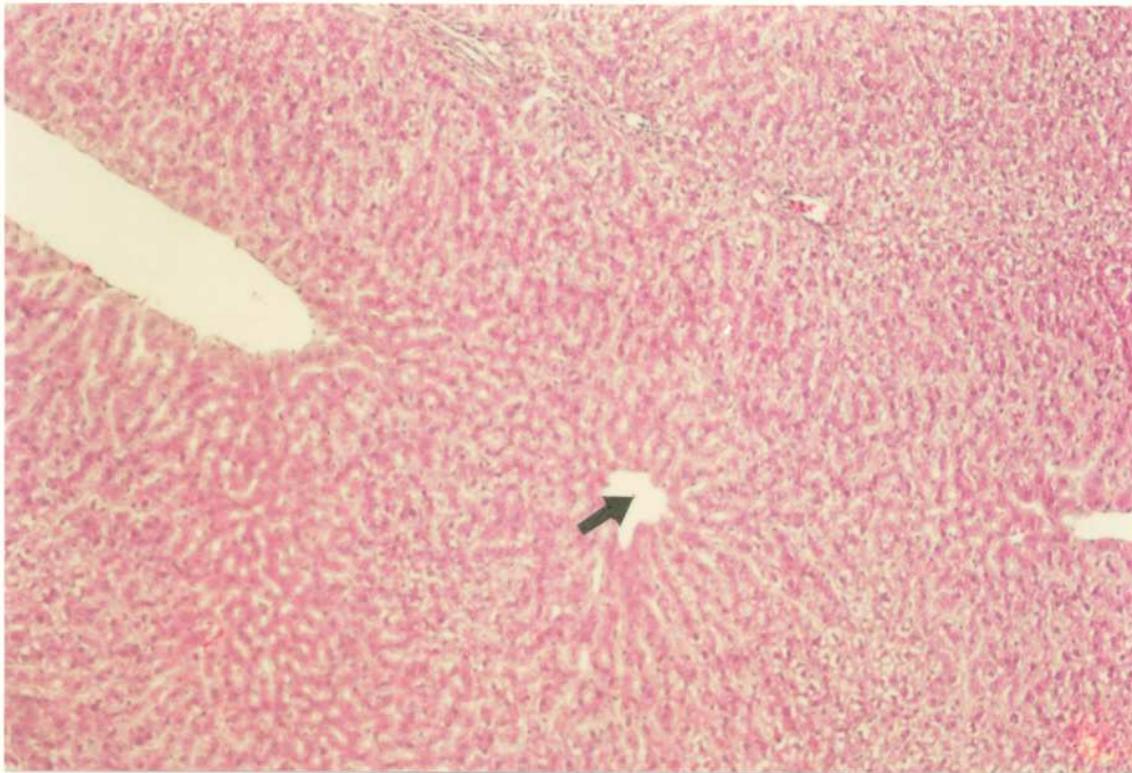


FIGURA 10 – Fotomicrografia de fígado (Grupo DE), tempo intermediário (40 dias), mostrando veia centro lobular (seta). HE. 90X.

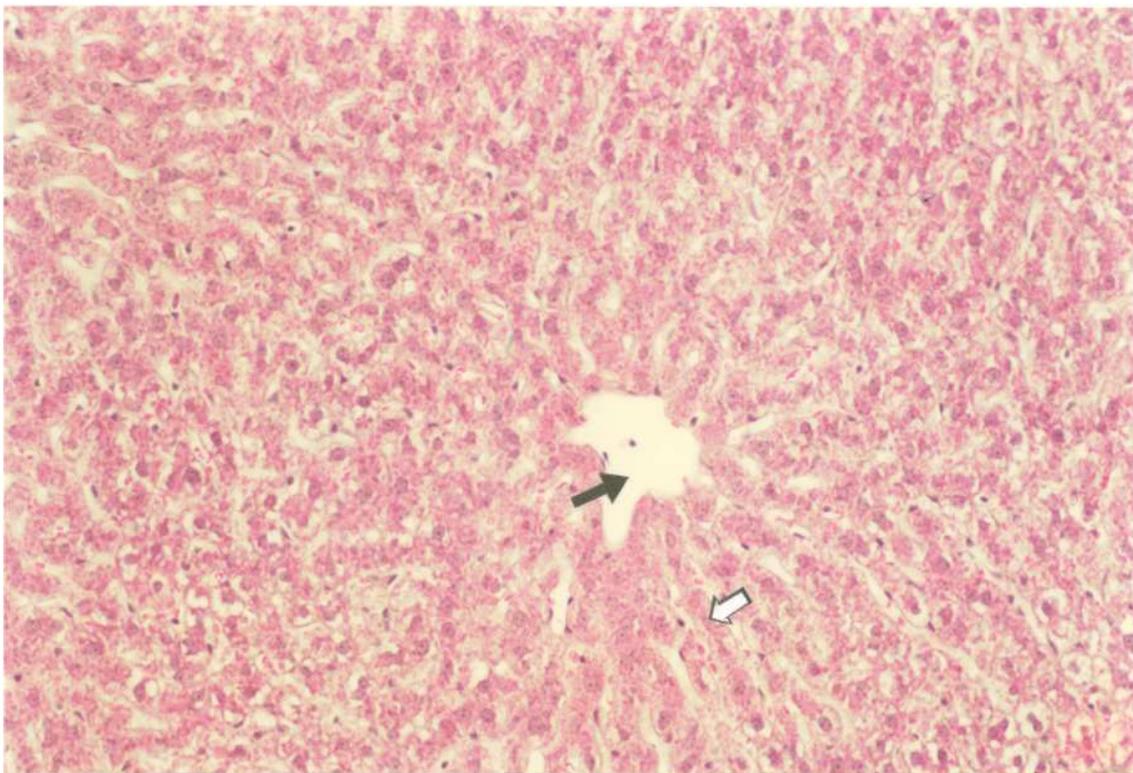


FIGURA 11 – Detalhe da figura anterior mostrando veia centro lobular (seta) e traves de hepatócitos (seta vazada). HE. 180X.

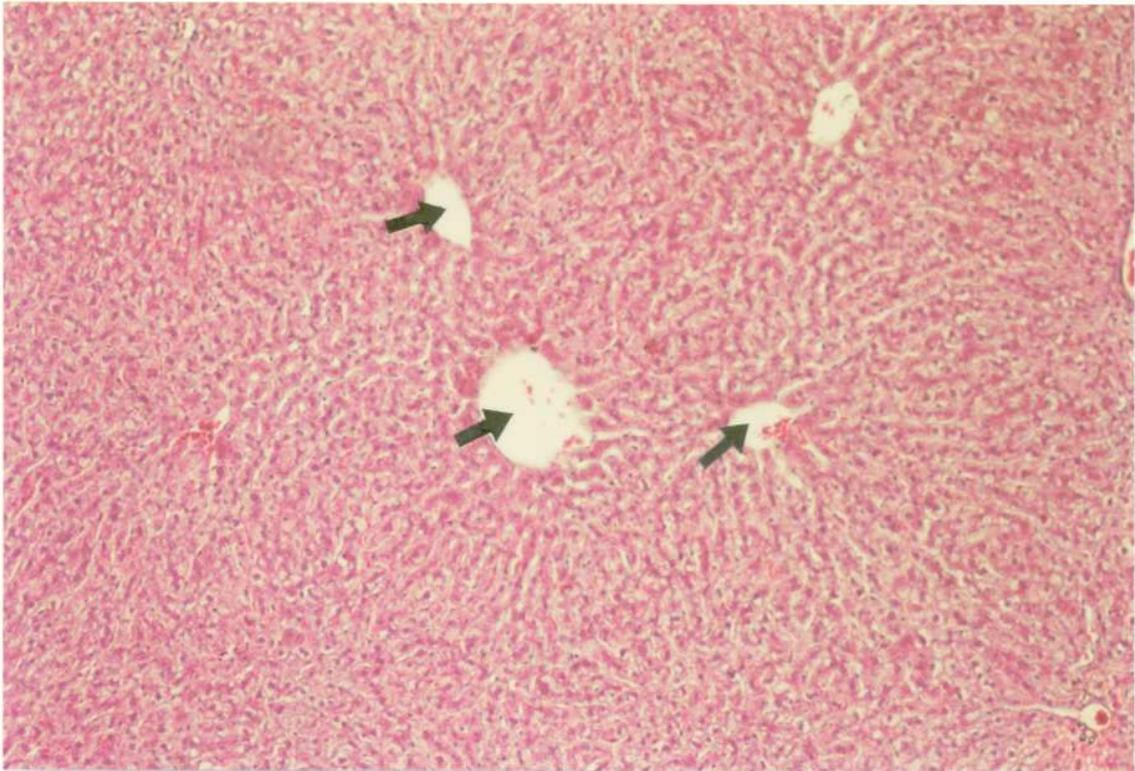


FIGURA 12 – Fotomicrografia de fígado (Grupo DE), tempo final (57 dias), mostrando veias centro lobulares (setas). HE. 90X.

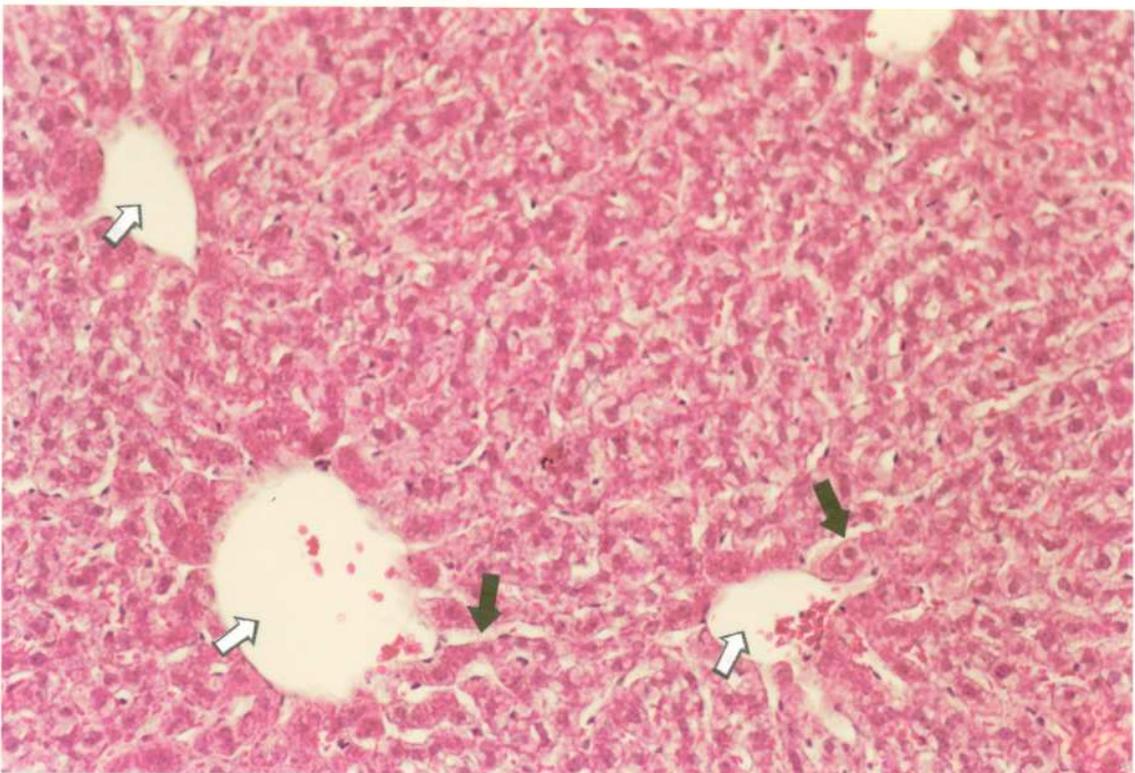


FIGURA 13 – Detalhe da figura anterior mostrando veias centrolobulares (setas vazadas) e espaços sinusóides (setas). HE. 180X.

4.3 Ensaio Biológico

Na Tabela 7 são apresentados, respectivamente, os resultados de ganho de peso e consumo de dieta, utilizados para cálculo do Quociente de Eficiência Protéica (PER) e Quociente de Conversão Alimentar (QCA), assim como os respectivos resultados de PER e QCA.

Tabela 7. Ganho de peso (g), consumo de proteína (g), Quociente de Eficiência Protéica (PER) e Quociente de Conversão Alimentar (QCA), em 28 dias, das dietas experimentais, CO: dieta controle - AIN-93G na forma íntegra com fonte protéica feijão-comum a 12%; DE: dieta AIN-93G com fonte protéica feijão-comum a 12% e depletada de cistina e vitamina E; EP: dieta AIN-93G com fonte protéica feijão-comum a 12% e depletada de cistina e vitamina E e suplementada com EPHINAL®; DD: dieta AIN-93G com fonte protéica feijão-comum a 12% e depletada de cistina e vitamina E e suplementada com DDOS.

Grupos	Ganho de peso (g)*	Consumo de P (g)*	PER*	QCA*
CO	105,6±10,7 ^a	55,7±4,3 ^a	1,9±0,1 ^a	0,24±0,02 ^a
DE	53,4±13,5 ^b	40,5±5,1 ^b	1,3±0,2 ^b	0,15±0,02 ^b
EP	26,2±8,2 ^c	29,1±5,1 ^c	0,9±0,2 ^c	0,11±0,02 ^c
DD	17,8±5,7 ^d	29,6±4,1 ^c	0,6±0,1 ^d	0,07±0,02 ^d

* Os resultados representam a média±desvio-padrão (n=7)

^{a, b, c, d} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05)

Para o tratamento aprotéico obteve-se uma perda de peso média de $15,3 \pm 2,4$ g. Entre os demais grupos experimentais observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) com relação ao ganho de peso. O grupo C mostrou o maior ganho de peso, seguido do grupo DE, EP e DD, como é mostrado na Figura 14. O consumo de proteína apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos nesta mesma seqüência, com exceção dos grupos EP e DD que não diferiram entre si.

A diferença entre o grupo CO e os demais com relação ao ganho de peso pode ser justificada por este grupo estar recebendo AIN-93G na sua forma íntegra, apenas com fonte protéica modificada para feijão-comum diferindo dos demais animais que receberam dietas depletadas. Com relação à diferença entre os grupos DE, EP e DD, supõe-se que as suplementações de vitamina E oferecidas aos grupos EP e DD, sendo estas de origem lipídica, tenham causado saciedade aos animais, fazendo com que estes tenham apresentado um menor ganho de peso, conseqüência de um menor consumo de dieta. Não foram utilizadas suplementações placebo para os grupos CO e EP por não ter sido encontrada uma fonte lipídica líquida isenta de vitamina E para este fim.

Observa-se também que entre os grupos suplementados, EP e DD, só houve diferença significativa ($p < 0,05$) com relação ao ganho de peso, o que pode estar sugerindo a possível presença de algum fator antinutricional não identificado no DDOS que tenha interferido no aproveitamento da dieta, visto que não houve diferença com relação ao consumo de dieta; entretanto, pôde-se constatar a não existência de toxicidade do DDOS, inclusive não tendo ocorrido nenhum óbito.

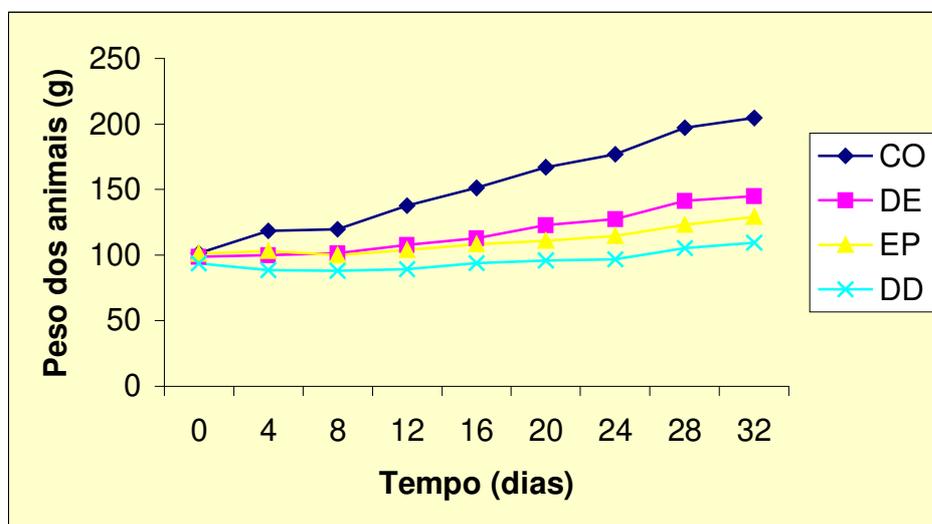


FIGURA 14. Evolução ponderal dos ratos durante 4 dias de adaptação às dietas experimentais, seguidos de 28 dias para cálculo do Quociente de Eficiência Protéica (PER) e Quociente de Conversão Alimentar (QCA), onde os animais foram pesados num intervalo de 4 dias e submetidos aos seguintes tratamentos: CO: dieta controle - AIN-93G na forma íntegra com fonte protéica feijão-comum a 12%; DE: dieta AIN-93G com fonte protéica feijão-comum a 12% e depletada de cistina e vitamina E; EP: dieta AIN-93G com fonte protéica feijão-comum a 12% e depletada de cistina e vitamina E e suplementada com EPHINAL®; DD: dieta AIN-93G com fonte protéica feijão-comum a 12% e depletada de cistina e vitamina E e suplementada com DDOS.

Os resultados de PER e QCA mostraram diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os tratamentos, sendo que, o maior valor encontra-se no grupo CO seguido do DE, EP e DD. Assim como para o ganho de peso e consumo de dieta, as suplementações lipídicas utilizadas como fonte de vitamina E causaram a diminuição dos índices PER e QCA, provavelmente devido à saciedade causada pelas suplementações, o que pode ser

confirmado por HUGHES *et alii* (1996) que utilizou em seu experimento feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) como fonte protéica e teve como resultado para o PER, valor igual a $1,9 \pm 0,05$, estando de acordo com o grupo CO, o qual não recebeu suplementação. As diferenças de PER e QCA são melhores visualizadas na Figura 15.

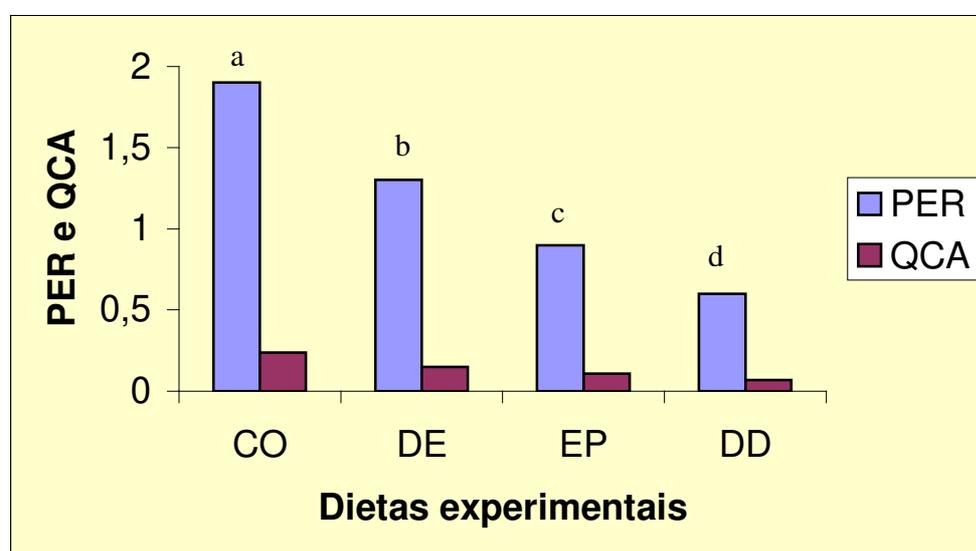


FIGURA 15. Quociente de Eficiência Protéica (PER) e Quociente de Conversão Alimentar (QCA), durante 28 dias, dos seguintes grupos experimentais: CO: dieta controle - AIN-93G na forma íntegra com fonte protéica feijão-comum a 12%; DE: dieta AIN-93G com fonte protéica feijão-comum a 12% e depletada de cistina e vitamina E; EP: dieta AIN-93G com fonte protéica feijão-comum a 12% e depletada de cistina e vitamina E e suplementada com EPHINAL®; DD: dieta AIN-93G com fonte protéica feijão-comum a 12% e depletada de cistina e vitamina E e suplementada com DDOS. As letras a, b, c e d demonstram diferença significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.

Apresenta-se na Tabela 8 os resultados referentes à digestibilidade aparente (DA) e digestibilidade corrigida pela dieta aprotéica (DC) das dietas experimentais, calculadas durante 4 dias de balanço de nitrogênio dos animais.

Tabela 8. Digestibilidade aparente e digestibilidade corrigida pela dieta aprotéica (%) após 4 dias de balanço de nitrogênio nos animais submetidos aos seguintes tratamentos: CO: dieta controle - AIN-93G na forma íntegra com fonte protéica feijão-comum a 12%; DE: dieta AIN-93G com fonte protéica feijão-comum a 12% e depletada de cistina e vitamina E; EP: dieta AIN-93G com fonte protéica feijão-comum a 12% e depletada de cistina e vitamina E e suplementada com EPHINAL[®]; DD: dieta AIN-93G com fonte protéica feijão-comum a 12% e depletada de cistina e vitamina E e suplementada com DDOS.

Dietas	Digestibilidade aparente *	Digestibilidade corrigida *
CO	56,7±2,6 ^a	59,6±2,5 ^a
DE	50,8±1,5 ^b	54,5±1,7 ^b
EP	54,2±3,6 ^{a, b}	59,6±3,8 ^a
DD	51,3±3,2 ^b	56,4±2,8 ^{a, b}

* Os resultados representam a média±desvio-padrão (n=7)

^{a, b, c, d} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05)

Quanto à absorção (digestibilidade corrigida), embora o resultado do grupo suplementado com DDOS (DD) apresentasse valores menores, não houve diferença significativa (p>0,05) com relação ao grupo CO. Já quando se fala em metabolismo intermediário (PER e QCA) (Tabela 7) as diferenças apresentaram significância (p<0,05), o que mostrou que a ação

do DDOS se deu mais intensamente ao nível de aproveitamento de aminoácidos, justificando as diferenças já citadas de ganho de peso entre os grupos suplementados EP e DD e a não existência de diferença entre o consumo de proteína destes mesmos grupos.

A digestibilidade da safra deste cultivar IAC-Carioca mostrou-se menor em relação a outras safras já trabalhadas no Laboratório do DEPAN (OLIVEIRA, 2001); isto se pode justificar por fatores edafoclimáticos ou de adubação, mas os dados estão de acordo com SGARBIERI (1996), que cita a digestibilidade do feijão em torno de 60%.

Com relação à digestibilidade corrigida, a suplementação com a vitamina E comercial - EPHINAL[®] (EP) mostrou diferença significativa somente com o tratamento DE. Já o grupo suplementado com DDOS (DD) apresentou uma digestibilidade sem diferença significativa do grupo que recebeu a vitamina purificada (EP). A efetividade da vitamina E como protetor à oxidação dos lípides hepáticos, conforme demonstrado pelos valores de TBA, apresentados na Tabela 6, foi menor para o grupo suplementado com DDOS (DD), quando comparado ao grupo suplementado com EPHINAL[®] (EP). Portanto, tanto o aproveitamento da dieta, NPR e QCA (Tabela 7) como a ação vitamínica E do DDOS parece estar sendo afetada por fatores antinutricionais ao nível de metabolismo secundário.

6 CONCLUSÕES

- A vitamina E presente no Destilado da Desodorização do Óleo de Soja (DDOS), embora com efeito inferior à forma de fármaco (EPHINAL), mostrou-se eficiente na proteção à oxidação dos lípidos hepáticos; por outro lado, o DDOS em sua forma bruta não apresentou toxicidade aos ratos. Entretanto, provavelmente por razões de saciedade, os ratos suplementados apresentaram menores valores de ganho de peso e indicadores de qualidade protéica.
- A bilirrubina não foi detectada em nenhum momento na urina dos animais, durante os 57 dias de experimento.
- O exame histológico mostrou fígados sem alteração estrutural, o que comprovou que nas condições experimentais que foram utilizadas, dietas deficientes em cistina e vitamina E não causaram necrose hepática nos animais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. E. M. **Obtenção de concentrado de tocoferóis à partir do destilado da desodorização do óleo de soja.** 2000. 123p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

AL MEDHDI, A. B.; DODIA, C.; JAIN, M. K.; FISHER, A. B. A phospholipase A₂ inhibitor decreases generation of thiobarbituric acid reative substances during lung ischemia-reperfusion. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1166, p.56-62, 1993.

ANGELUCCI, E.; CARVALHO, C. R. L.; CARVALHO, P. R. N.; FIGUEIREDO, I. B.; MONTOVANI, D. M. B.; MORAES, R. M. **Manual técnico de análises de alimentos.** Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1987. p.52-53.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis.** 12. ed. HORWITZ, W., ed. Washington D. C.: AOAC, 1975. p.927-928.

AUGUSTO, M. M. M. **Obtenção e caracterização de um concentrado de tocoferóis (vitamina E) a partir de destilado da desodorização do óleo de soja.** 1988. 125p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1988.

AZZI, A.; STOCKER, S. Vitamin E: non-antioxidant roles. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v.39, n.3, p.231-255, 2000.

BAKER, H. J.; LINDSEY, J. R.; WEISBROTH, S. H. The laboratory rat. v.I. **Biology and Disease**. Academic Press, 1979. p.83-95.

BAUERNFEIND, J. C. Tocopherols in food. In: MACHLIN, L. J. (Ed) **Vitamin E: a comprehensive treatise**. New York: Marcel Dekker, 1980, p.99-167.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. EDART – São Paulo Livraria e Editora Ltda, 1976, 241p.

BENZIE, I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **International Journal of Food Science and Nutrition**. Oxfordshire, v.47, p.233-261, 1996.

BLIGH, E. G., DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, n.8, p.911-917, 1959.

BLOCK, G.; LANGSETH, L. Antioxidant vitamins and disease prevention. **Food Technology**, Chicago, v.48, p.80-84, 1994.

BOURGEOIS, C. **Determination of vitamin E: tocopherols and tocotrienols**. London: Elsevier Applied Science, 1992, p.1-7.

BROWN, R. K.; KELLY, F. J. Peroxides and other products. In: PUNCHARD, N. A.; KELLY, F. J. (Ed) **Free radicals: a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1996, p. 119-131.

BURTON, G. W.; JOYCE, A.; INGOLD, K. U. Vitamin E: only lipid soluble chain breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.21, n.2, p.281-290, 1983.

CAMARGO, J. L. V.; ANGELELI, A. Y. O.; BURINI, R. C.; CAMPANA, A. O. Hepatic lesion in protein-deficient adult rats. **British Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v.59, n.1, p.158-166, 1978.

CARPENTER, K. J. The nutritional contribution of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) in perspective. **Food Technology**, Chicago, v.35, n.3, p.77, 1981.

CHIARELLO, P. G.; IGLESIAS, A. C.; ZUCOLOTO, S.; MORENO, F.; JORDÃO JR., A. A.; VANNUCCHI, H. Effect of a necrogenic dose of diethylnitrosamine on vitamin E – deficient and vitamin E – supplemented rats. **Food and Chemical Toxicology**, Elmsford, v.36, p.929-935, 1998.

COÊLHO, R. B. **Anatomia patológica das afecções hepáticas**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife: Editora Universidade de Pernambuco, 1971. p. 14-77.

COMBS JR., G. F. Vitamin E. The vitamins. **Fundamental Aspects in Nutrition & Health**. San Diego: Academic Press, 1992. p.179-203.

CONTRERAS-GUZMÁN, E. S.; STRONG, F. C. Determination of dl- α -tocopherol by reduction of cupric ion. **Journal of Official Analytical Chemists**, Washington, D.C., v.56, p. 1215-1221, 1982.

DESHPANDE, S. S.; NIELSEN, S. S. In vitro digestibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) protein: The role of heat-stable protease inhibitors. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, n.5, p.1330-1334, 1987.

DIAZ, C. A. P. **Utilização do DDOS como antioxidante na farinha de sardinha (*Sardinella brasiliensis*)**. 1987. 119p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1987.

FITE, G. L. The pathology of dietary liver necrosis – a preliminary report. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.57, p.831-838, 1954.

FOOD AND NUTRITION BOARD; NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES; NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Recommended dietary allowances**, 9.ed., Washington D.C.: National Academy of Sciences, 1980. p.43.

GAYOTTO, L. C. C.; ALVES, V. A. F. Marcadores histopatológicos de doenças hepáticas. In: MATTOS, A. A.; DANTAS, W (Ed.). **Compêndio de hepatologia**. São Paulo: Fundo Editorial BYK, 1995. p.57-76.

GOENA, M; MAZO, F.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, L.; TOSAR, A.; FRUHBECK, G.; SANTIDRIÁN, S. Effect of the raw legume *Vicia ervilia* on

muscle and liver protein metabolism in growing rats. **Revista Española de Fisiología**, Pamplona, n.45, p.55-60, 1989. Suplemento.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. **Antioxidants in Nutrition, Health, and Disease**. Oxford: Oxford University Press, 1994, p.41-62.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3.ed. New York: Oxford University Press, 1999, 936p.

HARPER, H. A.; RODWELL, V. W.; MAYES, P. A. **Manual de química fisiológica**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 1982, p.160-163.

HASSAN EL-MALLAH, M.; EL-SHAMI, S. M.; ZAHER, F. A. Studies on desodorization of soybean oil as potential sources of natural tocopherols. **Seifen-ole-fette-wachse**, Ausburg, v.116, n.6, p.199-201, 1990.

HAUMANN, B. F. Antioxidants: firms seeking products they can label as natural. **Inform**, Champaing, v.1, n.12, p.1002-1013, 1990.

HENNEKENS, C.; GAZIANO, J. M. Antioxidants and heart disease: epidemiology and clinical evidence. **Clinical Cardiology**, Easton, v.16, n.4, p.10-15, 1993. (supplement)

HESS, J. L. Vitamin E: α -tocopherol. In: ALCHER, R. G.; HESS, J. L. (Ed.). **Antioxidant in Higher Plants**. Boca Raton: CRC Press, 1993, p.11-134.

HOFFBAUER, F. W.; WITTENBURG, B. Dietary hepatic necrosis in the rat – absence of the cirrhosis following recurrent episodes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.57, p.843-861, 1954.

HUGHES, J. S.; ACEVEDO, R. B.; SWANSON, B. G. Effects of fiber and tannins on protein utilization in dry beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Research International**, Essex, v.29, n.3-4. p.331-338, 1996.

JONG, E. V. **Influência de dietas normo e hiperlipídicas sobre o perfil nutricional, parâmetros bioquímicos séricos e estruturais do fígado de rato wistar**. 1997. 140p. Tese (Doutorado em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

JUNGERMANN, K. Zonal liver cell heterogeneity. **Enzyme**, v.46, p.5-7, 1992.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p.270-286.

KAYDEN, H.; TRABER, M. Absorption, lipoprotein transport and regulation of plasma concentration of vitamin E in humans. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.34, n.1, p.343-358, 1993.

KRINSKY, N. I. Membrane antioxidants. **Annals New York Academy of Sciences**. .n.551, p.17-32, 1988.

LEES, R. **Manual de análisis de alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1979. p.124-125.

LIMA, E. S.; CARATIN, R. F.; SOLIS, V. S. Peroxidação dos ácidos graxos. In: CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. (Ed.). **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002. p. 405-418.

MACHLIN, L. J. Vitamin E. In: MACHLIN, L. J. **Handbook of vitamins: nutritional, biochemical & clinical aspects**. New York, 1984, p.99-145.

MACHLIN, L. J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, Bethesda, v.1, n.6, p.441-445, 1987.

MARQUEZ, U. M. L.; LAJOLO, F. M. In vivo Digestibility of Bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) Proteins: The role of Endogenous Protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.39, n.7, p.1211-1215, 1991.

MENDÉZ, M. H. M.; DERIVI, S. C. N.; FERNANDES, M. L.; OLIVEIRA, A. M. G. Insoluble dietary fiber of grain food legumes and protein digestibility. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.43, n.1, p.66-72, 1993.

MENEGUINI, R. A toxicidade do oxigênio. **Ciência Hoje**, v.5, n.28, p.57-62, 1987.

MODGIL, R.; MEHTA, U. Effect of *Callosobruchus chinensis* (Bruchid) infestation on antinutritional factors in factors in stored legumes. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v.50, n.4, p.317-323, 1997.

MOSSÉ, J. Nitrogen to protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seeds protein content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington D. C., v.38, n.1, p.18-24, 1990.

NELSON, J. S. Pathology of vitamin E deficiency. In: MACHLIN, L. J. (Ed.). **Vitamin E: a comprehensive treatise**. New York: Marcel Dekker, 1980. p.397-428.

OLIVEIRA, A. C.; QUEIROZ, K. S.; HELBIG, E.; REIS, S. M. P. M.; CARRARO, F. O processamento doméstico do feijão-comum ocasionou uma redução nos fatores antinutricionais fitatos e taninos, no teor de amido e em fatores de flatulência rafinose, estaquiose e verbascose. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.51, n.3, p.276-283, 2001.

OLIVEIRA, A. C. **Fatores endógenos e exógenos com influência na digestibilidade e valor biológico das proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.)**. 1986. 134p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1986.

PEARSON, D. **Técnicas de laboratório para el análisis de alimentos.** Zaragoza: Acribia, 1976. p.62-68.

PELLET, P. L.; YOUNG, V. R. **Nutritional evaluation of protein foods.** Tokio: The United Nations University, 1980, 154p.

PIKE, R.; BROWN, M. L. **Nutrition: an integrated approach.** 3.ed. New York: Macmillan, 1984, p.150-157.

PORTER, N. A.; CALDWELL, S. E.; MILLS, K. A. Mechanisms of free radical oxidation of insaturated lipids. **Lipids**, v.30, n.4, 1995.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR, G. C.; AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**. Philadelphia, v.123, n. 11, p.1939-1951, 1993.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Patologia estrutural e funcional.** 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986, p.387-415.

SANTIDRIÁN, S.; GOENA, M.; CUEVILLAS, F.; LARRALDE, J. Muscle protein sintesis of rats fed a kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) diet. **Revista Española de Fisiología**, Pamplona, v.1, n.44, p.109-110, 1988.

SASSE, D.; SPORTNITZ, U. M.; MALY, I. P. Liver architerture. **Enzyme**. V.46, n.1-3, p.8-32, 1992.

SCHWARZ, K. Production of dietary necrotic liver degeneration using American Torula Yeast. **Proceedings of the Society of Experimental and Biological Medicine**, Bethesda, v.77, p.818-823, 1951.

SCHWARZ, K. Factors protecting against dietary necrotic liver degeneration. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.57, p.878-887, 1954.

SGARBIERI, V. C.; WHITAKER, J. R. Physical, chemical, and nutritional properties of common bean (*phaseolus*) proteins. **Advances in Food Research**, San Diego, v.28, p.93-166, 1982.

SGARBIERI, V. C. **Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento**. São Paulo: Almed. 1987. p.160-161.

SGARBIERI, V. C. Composition and nutritive value of beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). **World Reviews of Nutrition and Dietetics**, Basel, v.60, p.132-198, 1989.

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

SHEABAR, F. Z.; NEEMAN, I. Concentration of tocopherols from soy oil deodorization scum. **La Rivista Italiana Delle Sostanze Garsse**. Milano v.LXIV, p.219-222, 1987.

SINNHUBER, R. O.; YU, T. C. 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. II. The quantitative determination of malonaldehyde. **Food Technology**, Chicago, v.12, p.9-12, 1958.

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, Washington D.C., v.30, n.3, p.1190-1206, 1958.

TAKUR, M. L.; SRIVASTA, V. S. Vitamin E metabolism and its application. **Nutrition Research**, Montreal, v.16, n.10, p.1767-1809, 1996.

TEZOTO, S.; SGARBIERI, V. C. Protein nutritive value of a new cultivar of bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington DC, v.38, n.4, p.1152-1156, 1990.

WATSON, K. S.; MEIRHOEFER, C. H. Use or disposal of by-products and spent material from the vegetable oil processing in the U.S. **Journal of American Oil Chemist's Society**, Chicago, v.53, p.437-442, 1976.