



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**ALEXANDRE COELHO SERQUIZ**

**EFEITO SACIETOGÊNICO DE UM NOVO INIBIDOR DE  
TRIPSINA DA PAÇOCA DO AMENDOIM COM AUMENTO  
PLASMÁTICO DE COLECISTOCININA (CCK)**

**NATAL/RN  
2012**

**ALEXANDRE COELHO SERQUIZ**

**EFEITO SACIETOGÊNICO DE UM NOVO INIBIDOR DE  
TRIPSINA DA PAÇOCA DO AMENDOIM COM AUMENTO  
PLASMÁTICO DE COLECISTOCININA (CCK)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Elizeu Antunes dos Santos  
Coorientadora: Ana Heloneida de Araújo  
Morais

**NATAL/RN  
2012**

Serquiz, Alexandre Coelho.

Efeito sacietogênico de um novo inibidor de tripsina da paçoca do amendoim com aumento plasmático de colecistocinina CCK / Alexandre Coelho Serquiz. - Natal, 2012.

97f. il.

Orientador: Prof. Dr. Elizeu Antunes dos Santos.

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Heloneida de Araújo Morais.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Departamento de Bioquímica.

1. Dieta - Dissertação. 2. Proteínas - Dissertação. 3. Obesidade - Dissertação. I. Santos, Elizeu Antunes dos. II. Morais, Ana Heloneida de Araújo. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSE01

CDU 641.56-056.255

**ALEXANDRE COELHO SERQUIZ**

**EFEITO SACIETOGÊNICO DE UM NOVO INIBIDOR DE TRIPSINA DA PAÇOCA  
DO AMENDOIM COM AUMENTO PLASMÁTICO DE COLECISTOCININA (CCK)**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA DE QUALIFICAÇÃO:**

---

Prof. Dr. Elizeu Antunes dos Santos  
Departamento de Bioquímica - UFRN  
Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana Augusto de Rezende  
Departamento de Análise Clínicas e Toxicológica – UFRN  
1º Examinador

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Liziane Maria de Lima  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
2º Examinador

*Aos meus pais Alexandre  
e Rosangela e ao meu  
irmão Felipe*

## AGRADECIMENTOS

*À deus por seu amor infinito e por todas as graças derramadas na minha vida.*

*À professora Dra Ana Heloneida, pela confiança e ensinamento em muitos anos de trabalho, você foi fundamental em grande parte das conquistas em minha vida. Ao professor Dr Elizeu Antunes por acreditar no projeto, pelos grandes ensinamentos, pela sua calma, você é mais que um professor.*

*Agradeço pela confiança e pelos valiosos conhecimentos transmitidos aos professores: Dra Adriana Uchôa, Dra Adelianna e todos os outros professores do Departamento de Bioquímica.*

*Aos professores componentes das bancas, pela atenção, esforço e ajuda indispensáveis para o aperfeiçoamento desta dissertação.*

*Ao meu pai Alexandre Serquiz, pela ajuda e força e apoio. Ao meu irmão Felipe Serquiz, que sempre acreditou e me incentivou. A minha querida tia, Vilma Coelho, pela atenção e cuidado prestado a minha pessoa.*

*Aos colegas do LQFPB, em especial: Anderson, Luciana pela sua ajuda nos momentos mais difíceis, meu primo Rafael Serquiz pela ajuda nos experimentos, Vanessa Andrade, Vanessa Lima, Joyce, Richele, Paula, Antonio, Ticiania, Rafael Russi, Jonalson. As meninas da nutrição, e em especial: Amanda, Gabi, Fabiana, Agnes, Thayane, Jéssica e Jussara.*

*Aos companheiros da minha turma de mestrado e a todos do departamento de nutrição (DNUT) em especial para minhas amigas Jeane e Dada (Daline) que tanto me ajudou nessa conquista.*

*Aos demais colegas de departamento e funcionários, sempre garantindo um ambiente adequado e organizado.*

## RESUMO

A obesidade é crescente, atingindo níveis epidêmicos, em muitas regiões do mundo. Estudos têm mostrado que o consumo de amendoins influencia no controle de peso e essa influência pode ser devido à ação sacietogênica de inibidores de tripsina que condicionam o aumento plasmático de colecistocinina (CCK). Além disso, o amendoim apresenta outros benefícios à saúde e essas atribuições têm garantido o aumento da sua produção e o consumo de vários de seus produtos, entre eles, a paçoca de amendoim. O objetivo deste estudo foi identificar a presença de um inibidor de tripsina na paçoca de amendoim e avaliar o seu efeito sobre o consumo alimentar, o ganho de peso e alterações histomorfológicas em camundongos *swiss* (n=8) e ratos *wistar* (n=6). Dietas experimentais foram preparadas com base na AIN-93G e suplementadas com a paçoca de amendoim ou com o inibidor de tripsina parcialmente purificado da paçoca de amendoim (AHTI). Ao final de cada tratamento, os animais foram anestesiados, eutanasiados e tiveram seus sangues colhidos, por punção cardíaca, para a dosagem de CCK e de outros parâmetros bioquímicos (glicose, triglicerídeos, colesterol total, lipoproteínas de alta-densidade, lipoproteína de baixa-densidade, transaminase glutâmica pirúvica, transaminase glutâmica oxalacética e albumina) e seus pâncreas extraídos para análise histológica e morfométrica. As suplementações com a paçoca de amendoim e com o AHTI mostraram uma diminuição do ganho de peso corporal e do consumo alimentar tanto em camundongos quanto em ratos, devido à saciedade, uma vez que os animais não apresentaram indícios de comprometimento do estado nutricional condicionada pelo consumo do AHTI. Não foram, também, observadas alterações bioquímicas, nem histomorfológicas importantes quando comparadas com os controles. No entanto, o AHTI levou ao aumento da secreção de CCK, um peptídeo sacietogênico. Assim, estes resultados sugerem que o AHTI, presente na paçoca de amendoim, seria capaz de aumentar a secreção plasmática de CCK e reduzir o ganho de peso associado com menor consumo alimentar de animais experimentais.

**Palavras - chave:** *Arachis hypogaea* L. Proteínas bioativas. Saciedade. Obesidade.

## ABSTRACT

Obesity is increasing, reaching epidemic levels in many regions of the world. Studies have shown that consumption of peanuts influences on weight control and this influence may be due to the action of trypsin inhibitors sacietogênica that condition increased plasma colescistocinina (CCK). Moreover, the peanut has other health benefits, and these assignments are guaranteed to increase their production and consumption of several of its products, including the paçoca peanut. The aim of this study was to identify the presence of a trypsin inhibitor in paçoca peanut and evaluate its effect on food intake, weight gain and histomorphological changes in swiss mice (n = 8) and Wistar rats (n = 6). Experimental diets were prepared based on the AIN-93G and supplemented with tack or peanut trypsin inhibitor partially purified paçoca peanut (AHTI). After each treatment, the animals were anesthetized and euthanized, their bloods were collected by cardiac puncture for the determination of CCK and other biochemical parameters (glucose, triglycerides, total cholesterol, high density lipoprotein, low density lipoprotein, glutamic-pyruvic transaminase, glutamic oxaloacetic transaminase and albumin) and their pancreas removed for histologic and morphometric analysis. The supplementation with paçoca peanut and the AHTI showed a decrease of body weight gain and food intake in both mice and rats, due to the satiety, since the animals showed no evidence of impairment of nutritional status conditioned by consumption the AHTI. There were also observed biochemical or morphological important when compared with controls. However, AHTI led to increased secretion of CCK, a peptide sacietogênico. Thus, these results indicate that AHTI present in paçoca peanut, is able to enhance the secretion of plasma CCK and thereby reduce the weight gain associated with lower food intake of experimenta animals.

**Key - words:** *Arachis hypogaea* L. Bioactive proteins. Satiety. obesity

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Sementes e planta de amendoim ( <i>arachis hypogaea</i> L.).	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 02 - Estrutura do Gene, DNA complementar e a forma pre- pre-pro-Hormonal de colecistocinina (CCK).....	29
Figura 03 - Sequência aminoacídica do peptídeo colecistocinina (CCK). .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 04 - Modelo de sinalização intracelular de secreção de colecistocinina (CCK)..	33
Figura 05 - Modelo proposto do papel do inibidor da ligação do diazepam (DBI), do fator liberador de CCK luminal (LCRF) e o peptídeo monitor na regulação da secreção de colecistocinina (CCK).....	36
Figura 06 - (a) Paçoca de amendoim (b) Composição Nutricional da paçoca de amendoim.....	39
Figura 07 - Fases do delineamento experimental com os animais.....	16
Figura 08 - Esquema de extração e fracionamento proteico com sulfato de amônio em três percentuais de saturação da paçoca de amendoim. ....	21
Figura 09 - Consumo alimentar médio em gramas por dia (g/dia) de camundongos <i>swiss</i> submetidos à Dieta Padrão (Grupo Padrão) e Dieta Hipercalórica (Grupo Teste) durante 14 semanas.....	33
Figura 10 - Evolução do ganho de peso corporal médio em gramas (g) de camundongos <i>swiss</i> submetidos à Dieta Padrão (Grupo Padrão) e Dieta Hipercalórica (Grupo Teste) durante 14 semanas.....	34
Figura 11 - Eficiência alimentar média em gramas por kilocalorias (g/Kcal) de camundongos <i>swiss</i> submetidos à Dieta Padrão (Grupo Padrão) e Dieta Hipercalórica (Grupo Teste) durante 14 semanas.....	35
Figura 12 - Histologia do pâncreas de camundongos <i>swiss</i> submetidos à Dieta Padrão (Grupo Padrão) e Dieta Hipercalórica (Grupo Teste) durante 14 semanas. ....	36

Figura 13 - Morfometria do pâncreas de camundongos <i>swiss</i> submetidos à Dieta Padrão (Grupo Padrão; GP) e Dieta Hipercalórica (Grupo Teste; GT) durante 14 semanas.....	36
Figura 14 - Inibição da atividade de tripsina pelo precipitado do extrato bruto (PEB), extrato bruto (EB) e frações proteicas saturadas com sulfato de amônio nas faixas de 0-30% (F1), 30-60% (F2) e 60-90% (F3) obtidos da farinha de paçoca de amendoim. ....	38
Figura 15 - Cromatografia de afinidade em Tripsina-Sepharose CL 4B da F2 de paçoca de amendoim e SDS-PAGE do AHTI.....	39
Figura 16 - Estabilidade do inibidor parcialmente purificado de paçoca de amendoim (AHTI) em diferentes temperaturas.....	41
Figura 17 - Estabilidade do inibidor parcialmente purificado de paçoca de amendoim (AHTI) à variação do pH.....	42
Figura 18 - Determinação do IC <sub>50</sub> do inibidor de tripsina purificado de paçoca de amendoim (AHTI).....	43
Figura 19 - Determinação do valor de Ki do inibidor de tripsina purificado de paçoca de amendoim (AHTI). ....	44
Figura 20 - Ganho de peso médio em gramas por dia (g/dia) de ratos <i>wistar</i> submetidos a Dieta Padrão, aprroteica, com paçoca de amendoim e com inibidor de tripsina de paçoca de amendoim (AHTI) durante 14 dias. ....	70
Figura 21 - Redução do consumo alimentar 1, 2 e 18 horas após a administração por gavagem de uma dose unica de concentrações diferentes de inibidores de tripsina durante 14 dias.....	73
Figura 22 - Níveis plasmáticos de cck em ratos <i>wistar</i> uma hora após a administração por gavagem de uma dose unica de diferentes concentrações de inibidores de tripsina durante 14 dias.....	77

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Produtos industrializados à base de amendoim distribuídos por categoria de produtos.....	2
---	---

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Classificação dos inibidores de protease de plantas.....	27
Tabela 02 - Composição centesimal e percentual de contribuição dos macronutrientes em 100 g das dietas padrão (DP) e hipercalórica (DH) de acordo com o programa Diet Pro®. ....	16
Tabela 03 - Composições das dietas experimentais utilizadas para os ratos <i>wistar</i> no experimento de digestibilidade proteica. ....	25
Tabela 04 - Parâmetros bioquímicos plasmáticos de camundongos <i>swiss</i> submetidos à Dieta Padrão e Dieta Hipercalórica durante 14 semanas. ....	37
Tabela 05 - Etapas da purificação parcial do AHTI. ....	40
Tabela 06 - Parâmetros da Digestibilidade Verdadeira (Dv) e Aparente (Da) em ratos <i>wistar</i> submetidos a dieta padrão, aprotéica, com paçoca de amendoim e com inibidor de tripsina de paçoca de amendoim (AHTI) durante 14 dias.....	69
Tabela 07 - Consumo alimentar médio em gramas (g/dia), no 1º dia, 5º dia e 10º dia de ratos <i>wistar</i> submetidos a dieta Padrão, aprotéica, com paçoca de amendoim e com inibidor de tripsina de paçoca de amendoim (AHTI) durante 14 dias.....	71
Tabela 08 - Parâmetros bioquímicos plasmáticos de ratos <i>wistar</i> submetidos a dieta padrão, aprotéica, com paçoca de amendoim e com inibidor de tripsina de paçoca de amendoim (AHTI) durante 14 dias. ....	72
Tabela 09 - Parâmetros bioquímicos plasmáticos de ratos <i>wistar</i> uma hora após a administração por gavagem de uma dose única de diferentes concentrações de inibidores de tripsina durante 14 dias.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACh	Acetilcolina
ANVISA	Agência nacional de vigilância nutricional
CCK	Colecistocinina
SNC	Sistema Nervoso Central
COL	Colesterol Total
DBI	Inibidor da ligação do diazepam
DH	Dieta Hipercalórica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Dieta Padrão
DV	Digestibilidade Verdadeira
EA	Eficiência alimentar
EB	Extrato Bruto
GL	Glicose
GP	Grupo padrão
HDL	Lipoproteínas de alta
IMC	Índice de Massa corporal
LDL	Lipoproteínas de baixa
LCRF	Fator Liberador de CCK Luminal
PEB	Precipitado do Extrato Bruto
TG	Triglicerídeos
TGO	Transaminase Glutâmica Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmica Pirúvica
RNA	Ácido Ribonucleico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
2.1	AMENDOIM.....	19
<b>2.1.1</b>	<b>História, cultivo e propriedades do amendoim.....</b>	<b>19</b>
2.2	INIBIDORES DE PROTEASES.....	25
2.3	OBESIDADE .....	28
2.4	COLECISTOCININA.....	30
<b>2.4.1</b>	<b>Mecanismo da saciedade: inibidores de tripsina x colecistocinina ..</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
4.1	MATERIAIS .....	39
<b>4.1.1</b>	<b>Paçoca de amendoim.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Animais .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Enzimas, substratos e reagentes.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Equipamentos.....</b>	<b>41</b>
4.2	MÉTODOS .....	41
<b>4.2.1</b>	<b>Fases do delineamento experimental.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Avaliação do ganho de peso e consumo alimentar em camundongos <i>swiss</i> submetidos à dieta hipercalórica rica em paçoca de amendoim .....</b>	<b>16</b>
4.2.2.1	Dietas .....	16
4.2.2.2	Animais.....	17
4.2.2.1.1	<u>Consumo alimentar</u> .....	17
4.2.2.1.2	<u>Evolução do peso corporal</u> .....	17
4.2.2.1.3	<u>Eficiência alimentar</u> .....	17

4.2.3	<b>Avaliação dos parâmetros bioquímicos em camundongos <i>swiss</i> submetidos à dieta hipercalórica rica em paçoca de amendoim .....</b>	<b>18</b>
4.2.4	<b>Avaliação dos efeitos morfofisiológicos em pâncreas de camundongos <i>swiss</i> submetidos à dieta hipercalórica rica em paçoca de amendoim .....</b>	<b>19</b>
4.2.5	<b>Obtenção do extrato bruto e fracionamento proteico da paçoca de amendoim .....</b>	<b>19</b>
4.2.6	<b>Obtenção do retido em tripsina da F2 por cromatografia de afinidade em matriz de tripsina-sepharose 4B .....</b>	<b>22</b>
4.2.7	<b>Avaliação do grau de pureza e determinação da massa molecular dos inibidores proteicos .....</b>	<b>22</b>
4.2.8	<b>Determinações de proteínas solúveis .....</b>	<b>23</b>
4.2.9	<b>Atividades antitriptica do extrato e frações proteicas determinações de proteínas solúveis.....</b>	<b>23</b>
4.2.10	<b>Estabilidade do AHTI em variações de temperaturas e pHs .....</b>	<b>24</b>
4.2.11	<b>Propriedades inibitórias e determinação da constante de inibição...</b>	<b>24</b>
4.3.11.1	Determinação da IC <sub>50</sub> para tripsina .....	24
4.2.11.2	Determinação da constante de inibição e do mecanismo de inibição para tripsina.....	25
4.2.12	<b>Avaliação do ganho de peso e consumo alimentar em ratos <i>wistar</i> submetidos à dieta com inibidor de tripsina .....</b>	<b>25</b>
4.2.12.1	Dietas .....	25
4.2.12.2	Animais.....	26
4.2.13	<b>Avaliação da digestibilidade proteica em ratos <i>wistar</i> .....</b>	<b>26</b>
4.2.14	<b>Avaliação dos parâmetros bioquímicos em ratos <i>wistar</i> submetidos à dieta com inibidor de tripsina .....</b>	<b>27</b>
4.2.15	<b>Avaliação do consumo alimentar em tempos específicos, dos parâmetros bioquímicos e de CCK em ratos <i>wistar</i> submetidos à dieta com inibidor de tripsina .....</b>	<b>28</b>
4.2.15.1	Dietas.....	28
4.2.15.2	Animais .....	28
4.2.15.3	Consumo alimentar .....	28
4.2.15.4	Parâmetros bioquímicos.....	29
4.2.15.5	Dosagem de CCK .....	29

4.2.15.5.a	Coleta do sangue.....	29
4.2.15.5.b	Extração do plasma .....	30
4.2.15.5.c	Imunoensaio .....	30
4.2.16	<b>Análises estatísticas .....</b>	<b>31</b>
5	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
5.1	AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO E CONSUMO ALIMENTAR EM CAMUNDONGOS <i>SWISS</i> SUBMETIDOS À DIETA HIPERCALÓRICA RICA EM PAÇOCA DE AMENDOIM.....	32
5.2	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MORFOFISIOLÓGICOS EM ÓRGÃOS DE CAMUNDONGOS <i>SWISS</i> SUBMETIDOS À DIETA HIPERCALÓRICA RICA EM PAÇOCA DE AMENDOIM.....	35
5.3	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS <i>SWISS</i> SUBMETIDOS À DIETA HIPERCALÓRICA RICA EM PAÇOCA DE AMENDOIM.....	37
5.4	ISOLAMENTOS DO INIBIDOR DE TRIPSINA DA PAÇOCA DE AMENDOIM.....	37
5.4.1	<b>Atividades antitriptica do extrato e frações proteicas e determinações de proteínas solúveis.....</b>	<b>37</b>
5.4.2	<b>Avaliação do grau de pureza e determinação da massa molecular dos inibidores proteicos por eletroforese em gel de poliacrilamida descontínuo e desnaturante (SDS-PAGE).....</b>	<b>38</b>
5.4.3	<b>Estabilidade do AHTI em variações de temperaturas e pH .....</b>	<b>40</b>
5.4.4	<b>Propriedades inibitórias e determinação da constante de inibição...42</b>	
5.5	AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO E DO CONSUMO ALIMENTAR EM RATOS <i>WISTAR</i> SUBMETIDOS À DIETA COM INIBIDOR DE TRIPSINA .....	44
5.5.1	<b>Avaliação da digestibilidade proteica em ratos <i>wistar</i> .....</b>	<b>44</b>
5.6	AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR EM TEMPOS ESPECÍFICOS, DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DE CCK EM RATOS <i>WISTAR</i> SUBMETIDOS À DIETA COM INIBIDOR DE TRIPSINA .....	73
6	<b>DISCUSSÕES.....</b>	<b>78</b>
7	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>86</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Uma dieta adequada e balanceada é aquela que atinge todas as necessidades nutricionais para a manutenção, reparo, processos de crescimento ou desenvolvimento de um indivíduo. Tal dieta inclui todos os nutrientes em quantidades apropriadas e proporcionais uns aos outros. A presença ou ausência de um nutriente essencial pode afetar a disponibilidade, absorção, metabolismo ou necessidades dietéticas de outros, além de ser de fator determinante de diversas patologias (SICHIERI, et al., 2000; VALENTE, 2002).

A obesidade se destaca entre as doenças causadas pelas inadequações nutricionais e é crescente em muitas regiões do mundo, principalmente em países desenvolvidos, atingindo níveis epidêmicos (WHO, 2004; IBGE, 2010; BRASIL, 2011). Indivíduos obesos podem apresentar diminuição do tempo de vida por um aumento da prevalência de diversas doenças crônicas não transmissíveis como: diabetes, hipertensão, neoplasias, doenças respiratórias crônicas, doenças renais e músculo-esqueléticas (MUST et al., 1999).

O aumento da massa corpórea também pode estar associado a um aumento de lipoproteínas circulantes no plasma, podendo desencadear dislipidemias, aterosclerose e doenças cardiovasculares (SPOSITO et al., 2007).

Assim, para minimizar as inadequações alimentares que desencadeiam a obesidade, é necessário, principalmente, reduzir o consumo de alimentos de origem animal com alto teor de gorduras saturadas e ricos em açúcares simples; e, em contrapartida, estimular o consumo de alimentos com teores consideráveis de minerais, vitaminas, fibras e ácidos graxos essenciais poli-insaturados, nutrientes, geralmente encontrados em sementes oleaginosas e nozes (VENKATACHALAM; SATHE, 2006).

As oleaginosas são alimentos, que, independentemente do seu alto teor lipídico, têm demonstrado efeitos benéficos para a saúde (TRAORET, et al., 2008). O consumo de sementes oleaginosas tem sido encorajado, pelo FDA (*Food and Drug Administration*) que recomenda o seu consumo por, pelo menos, 5 vezes na semana (140 g/semana). A qualidade da dieta pode ser implementada com o

consumo dessas sementes (GRIEL et al., 2004), aumentando as opções de alimentos palatáveis e benéficos, que podem ajudar a promover a adesão a um estilo de vida mais saudável e hábitos nutricionais mais adequados.

O amendoim, dentre essas sementes, é uma das mais consumidas no Brasil, representando uma importante fonte de proteína e óleo. Seu grande impacto econômico se deve principalmente às várias formas de consumo.

Diversos estudos (KRIS-ETHERTON et al., 1999; CHISHOLM et al., 2005; JIANG; JACOBS; MAYER-DAVIS, 2006; SHERIDAN, 2007; GEBAUER et al., 2008) têm provado que o consumo de amendoim e outras sementes oleaginosas (*nuts*) como nozes, amêndoas, castanhas, avelãs e pistache diminuem o risco de doenças cardiovasculares, reduzindo principalmente LDLc e triacilgliceróis, bem como as citocinas inflamatórias e ainda sugerem que promovam menor ganho de peso em animais e humanos.

Embora tenham elevado valor energético, pesquisas têm apontado diversas hipóteses para justificar sua relação com a redução no ganho de peso; dentre elas, acredita-se que parte da energia não está disponível ou pode haver, nessas sementes, algum componente que permita maior gasto metabólico, provocando menor ganho de peso em relação ao esperado (TRAORET et al., 2008; DEVITT et al., 2011). Outra possibilidade é o seu poder de causar saciedade, sendo atribuído como gerar a sua peculiar composição lipídica, de fibras, de proteínas, além de haver relatos na literatura que postulam que a presença e influência de inibidores de tripsina podem levar à redução no ganho de peso. Nesse contexto, cabe ressaltar que os inibidores de tripsina elevam a concentração do hormônio colecistocinina (CCK), que tem poder sacietógeno (HILL et al., 1990; NAKAJIMA et al., 2011; KOMARNYTSKY; COOK; RASKIN, 2011; CHEN et al., 2012). Ademais, há trabalhos publicados que confirmam a presença no amendoim do inibidor enzimático de tripsina (TUR-SINAI, 1972; NORIOKA, OMICHI, IKENARA, 1982; MALEKI et al., 2003; DODO et al., 2004).

A medida que novos estudos vão sendo desenvolvidos sob a alegação do consumo do amendoim, vários alimentos à base dessa leguminosa estão sendo, cada vez mais, consumidos no Brasil, dentre eles: o óleo de amendoim, a pasta de

amendoim e a paçoca de amendoim, sendo este último produto consumido como sobremesa tipicamente nordestina. Neste sentido é evidente a importância de estudos que esclareçam se os benefícios atribuídos ao amendoim se estendem aos seus produtos derivados, para que a sociedade os conheça e saiba aproveitar todas as suas qualidades de forma ampla.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 AMENDOIM

#### 2.1.1 História, cultivo e propriedades do Amendoim

As plantas do gênero *Arachis* L. (Figura 01) pertencem à família Fabaceae e incluem 80 espécies descritas, reunidas em nove seções taxonômicas baseadas na morfologia, distribuição geográfica e compatibilidade cruzada (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994; VALLS; SIMPSON, 2005). A seção *Arachis hypogaea* é a maior e mais diversificada e abriga espécies de amendoim, sendo cultivadas as suas sementes e vagens. Há também espécies forrageiras: *A. pintoi*, *A. glabrata* e *A. sylvestris* (VALLS; SIMPSON, 2005). O amendoim cultivado é dividido em duas subespécies, a *A. hypogaea* e *A. hypogaea fastigiata*, com base no hábito de crescimento e na presença e ausência de flores sobre seu eixo principal. A subespécie *A. h. hypogaea* é novamente dividida em duas variedades botânicas (var. *hypogaea* e var. *hirsuta*) e a subespécie *A. h. fastigiata* é dividida em quatro variedades botânicas (var. *fastigiata*, var. *peruviana*, var. *equatoriana* e var. *vulgares*) baseadas nas características da semente e da vagem.

O amendoim cultivado (*A. hypogaea* L.) tem quantificação genica tetraploide ( $4n=40$  cromossomos) com fórmula genômica AABB. Acredita-se que a origem do amendoim tenha sido por meio de duas espécies distintas diploides ( $2n = 20$  cromossomos), uma com um genoma A, e outra com um genoma B (HALWARD et al., 1991;. YOUNG; WEEDEN; KOCHERT, 1996). A planta tetraploide resultante foi selecionada e cultivada em diversas regiões da América do Sul por mais de 5000 anos, e se espalhou pelo mundo na época da descoberta do Novo Mundo, ou mesmo antes disso, seguindo rotas pré-colombianas de navegação no Oceano Pacífico (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994). O amendoim nativo da América do Sul e o seu provável centro de origem é na região Central do Brasil, uma região que se estende do sudoeste de Mato Grosso do Sul (fronteira com o Paraguai) para o sul de Goiás (FREITAS; MORETZSOHN; VALLS, 2007).



Figura 01 - Sementes e planta de amendoim (*Arachis hypogaea* L.).

**Fonte:** <http://teresasilvestri.blogspot.com.br/2009/06/amendoim-outro-integrante-das-festas.html> e <http://www.nordeste rural.com.br/nordeste rural/home.asp>

No que se refere às sementes de amendoim, não existe nenhuma cultivar protegida no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares do Ministério de Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA) cuja produção exija licença/pagamento de *royalties*. Existem onze cultivares registrados no Registro Nacional de Cultivares, apto para produção e comercialização no país: Na Embrapa (BR 1 e BRS 151-L7); no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC 22, IAC 5, IAC 8112, IAC Caiapó, IAC Tatú ST, Runner IAC 886 e Tatu Vermelho); no Comércio e Indústria Matsuda Importadora e Exportadora (Amarillo MG-100); e no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR 25 - Ticão).

Atualmente, o Amendoim é a quarta maior cultura de oleaginosa no mundo sendo cultivada em mais de 100 países com uma produção de 35.5 milhões de toneladas, ficando atrás apenas, na safra mundial de 2001/02, da soja (56,8% do total da safra mundial); do algodão (11,3% do total) e da colza (11,1% do total) (CONAB, 2012).

De acordo com os últimos dados divulgados pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), publicados em 2012, os maiores produtores mundiais de amendoim na safra 2002 foram: a China (43,9% da produção mundial); a Índia (22,9% do total); os Estados Unidos (5,3% do total); a Nigéria (4,5% do total); a Indonésia (3 % do total) e o Senegal (2,7% do total), ficando o Brasil em um distante 13º lugar, com uma produção de 294.7 mil toneladas ou 0,6% da produção mundial. Ainda em 2009, no Brasil, o destaque fica para o amendoim descascado que

respondeu por 58% do volume total exportado das mercadorias da cadeia de produção do amendoim, em torno de 86 mil toneladas e, também, para o óleo bruto com 40% desse total (MARTINS, 2010). O predomínio de cultivo no Brasil é no estado de São Paulo (SANTOS, et al, 2011). A região Nordeste produz 2 mil toneladas de amendoim (CONAB, 2012).

De acordo com a CONAB (2012), o consumo de amendoim é da ordem de 294,7 milhões de toneladas na safra de 2011/12, com tendência para crescimento. O produto é conhecido e consumido do norte ao sul do país, mas a oferta de uma ampla gama de petiscos e confeitos industrializados à base de amendoim é concentrada no Estado de São Paulo, onde se localizam as grandes áreas de produção agrícola.

O resgate do amendoim como um alimento nutritivo e funcional com garantia de qualidade é um dos principais objetivos do Pró-Amendoim. Trata-se de um programa de autorregulamentação lançado, em 2001 pela Associação Brasileira da Indústria de Chocolate, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados (ABICAD), sendo um dos principais interesses incentivar a pesquisa sistemática visando potencializar os atributos nutricionais e funcionais do amendoim, levando sempre em consideração a dose resposta às mais diversas aplicações na saúde. O programa atua no sentido de melhorar a qualidade do produto *in natura* e industrializado, e faz monitoramento da qualidade dos produtos feitos com amendoim de maneira sistemática e metódica. Desde 2002, a ABICAB tem credenciado empresas associadas ao Pró-amendoim certificando seus produtos à base de amendoim com o Selo de Qualidade. Dessa forma, os produtos trazem uma informação visual nas embalagens garantindo que aquele produto foi industrializado com um rígido controle de qualidade e é seguro, visto do perigo do consumo do amendoim e seus derivados contaminados por fungos que produzem a aflatoxina que é tóxica, trazendo sérias complicações à saúde.

Relacionado ao aspecto nutritivo, alguns estudos (USDA, 2010) mostram que 100 g de amendoim torrado sem adição de óleo, fornecem aproximadamente 615 kcal, 20 g de carboidrato, 51 g de lipídios, 26 g de proteínas, 2 g de cinzas e 8 g de fibras. Essa é a razão pela qual, o amendoim é considerado, em nível mundial, uma importante fonte de proteína e óleo, além de apresentar alto valor energético. Seu

consumo também promove aumento do consumo alimentar de alguns micronutrientes (vitaminas do complexo B, vitamina E, cálcio, fósforo, potássio e zinco) – Uma porção de 100 g fornece de 45 a 65% das recomendações diárias (RDA) destes para adultos (UNICAMP, 2011).

O amendoim, mesmo se destacando entre as oleaginosas por se apresentar como fonte de vitaminas e minerais, contém também uma série de substâncias bioativas, que são capazes de sequestrar diretamente os radicais livres. Exemplos delas são: os polifenóis (ácido cumárico, ácido ferúlico, lecitinas polifenólicas, resveratrol, etc), tocoferóis, flavonoides, esteróis e folato, e os inibidores de protease que, além de atuarem em importantes funções do organismo, atuam, também como antioxidantes (LOU et al., 2004).

Dessa maneira, o amendoim é uma leguminosa que devido a sua composição é reconhecida cientificamente por oferecer excelente nutrição, prevenção de doenças cardiovasculares, diminuição de colesterol e triglicérides, equilíbrio do metabolismo, suprimento de vitaminas e minerais, fibras, fitoquímicos e também por ser fator de inibição de apetite (ALPER; MATTES, 2002; MATTES; KIRKMEYER; 2000). Mundialmente conhecidos como “nuts”, são alimentos que, independente de seu alto teor lipídico, possuem evidências convincentes de que, mesmo sendo de alta densidade energética não representam fatores de risco para o ganho de peso e obesidade (GARCÍA-LORDA; MEGIAS; SALAS-SALVADÓ, 2003; MATTES; KRIS-ETHERTON; FOSTER, 2008; OMS/FAO, 2003).

Existem alguns prováveis mecanismos que respondem ao efeito de controle de peso quando o consumo dessa semente oleaginosa está aliada a uma dieta. Porém, a associação inversa entre consumo de sementes oleaginosas e o peso ou índice de massa corporal (IMC) podem ser atribuídos a vários fatores. Entre eles, seu efeito sobre o apetite, mais especificamente, a saciedade. O amendoim tem um alto valor calórico, além de rico em fibras e proteína o que pode promover aumento da saciedade (BURTON-FREEMAN, 2000; MATTES; KIRKMEYER, 2000). Em um estudo agudo de pré-carga, o amendoim exerceu uma forte supressão sobre a fome e a compensação calórica (MATTES; KIRKMEYER, 2000).

Mattes, Kris-etherton e Foster, (2008) citaram alguns fatores que podem explicar o mecanismo pelo qual o amendoim exerce esse efeito sobre o peso corporal. Primeiro exatamente por possuir alto teor de fibras alimentares e proteínas, ele promove supressão da fome e compensação de energia, assim o valor energético consumido não se eleva significativamente. Segundo, por não ser totalmente absorvido, principalmente na forma *in natura*, e ainda promover uma menor biodisponibilidade com a perda de alguns nutrientes nas fezes como proteínas, gorduras e alguns micronutrientes e vitaminas. E terceiro, pelo fato de seu alto nível de ácidos graxos insaturados e de proteína aumentar o gasto energético de indivíduos, devido à maior taxa metabólica.

O amendoim pode ser consumido de diversas formas, destacando-se os alimentos semiprocessados e processados (quadro 1). No caso de alimentos semiprocessados, um dos mais presentes na alimentação do brasileiro é o confeito de amendoim tipo japonês (MACHADO, 2006).

Quadro 1 - Produtos industrializados à base de amendoim distribuídos por categoria de produtos.

Categories de produtos	Confeitos de amendoim	Snacks de amendoim (condimentado)	Doces de amendoim	Outros tipos
<b>Tipos de produtos à base de amendoim</b>	-amendoim colorido; -amendoim de chocolate; -amendoim branco.	-amendoim tipo japonês; -amendoim frito com pele; -amendoim frito sem pele; -amendoim salgado temperado; -amendoim torrado com casca; -amendoim torrado bijú; -salgadinho de amendoim; -ovinhos de amendoim; -amendoim doce pralinê.	-paçoca; -paçoca rolha; -pé-de-moleque; -doce de amendoim gibi.	-crocantes granulados de amendoim; -pasta de amendoim torrado; -recheio cremoso de amendoim; -amendoim cru ( <i>in natura</i> ).

Fonte: Machado, (2006).

A paçoca de amendoim também é um alimento processado e igualmente, ao confeito, constitui um dos mais populares derivados do amendoim. Em 2010, a Abicab encomendou uma pesquisa ao Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística (Ibope), e obteve que 66% da população brasileira costuma consumir amendoim. Quando se questiona sobre o consumo de produtos oriundos do mesmo, como a paçoca de amendoim, essa porcentagem sobe para 75%. A produção da paçoca é obtida, primeiramente, pela torração dos grãos, e em seguida, pela

moagem até a obtenção de uma massa fina, por último ocorre a homogeneização dessa massa com uma mistura de ingredientes específicos (CÂMARA; GODOY; FONSECA, 1982). A paçoquinha, como é popularmente conhecida em algumas regiões, tem o amendoim como o ingrediente principal nas formulações para o seu preparo. Além dele, outros ingredientes, fubá, açúcar, mel e gordura participam também em maiores ou menores proporções (MACHADO, 2006).

Além dos estudos relacionados ao amendoim, diversas investigações vêm sendo realizadas com os seus alimentos derivados visando identificar se as suas propriedades se mantêm, mesmo diante dos mais diversos processamentos. Sales et al. (2005) testaram o óleo de amendoim em comparação ao óleo de açafrão e azeite de oliva, no perfil lipídico, na composição corporal e na saciedade de indivíduos eutróficos, com níveis normais de colesterol. Coelho et al.(2006), com o mesmo desenho experimental, avaliaram os efeitos do óleo de amendoim em indivíduos com sobrepeso. Nesses dois trabalhos, foi verificado menor ganho de peso dos indivíduos que consumiram óleo de amendoim. Foi identificado aumento no gasto metabólico basal dos indivíduos com sobrepeso que consumiram o óleo de amendoim, promovendo o menor ganho de peso em relação ao esperado pelo consumo energético dos voluntários, comprovando o efeito que tem sido relatado em outros trabalhos para os produtos do amendoim.

Segundo Mattes e Kirkmeyer (2000), lanches contendo manteiga de amendoim constitui uma maneira efetiva de controlar a fome. Este benefício é mais aparente quando os amendoins são substituídos por alimentos ricos em gordura saturada e consumidos como parte de um dieta equilibrada com teor baixo de gordura saturada e colesterol (THE PEANUT INSTITUTE, 2004).

Relacionada aos mecanismos que justificam a saciedade e consequente redução no ganho de peso, é importante ressaltar que a presença de inibidores de proteases tem apresentado ação terapêutica no tratamento de algumas patologias, inclusive da obesidade (HILL et al., 1990). No caso, em particular dos inibidores de tripsina, a diminuição da atividade de tripsina livre reduz a quebra de peptídeos monomeros que sinalizam para a liberação de colecistocinina (CCK), hormônio envolvido na sensação de saciedade intrinsecamente ligado ao ganho de peso

(KISSILEFF et al., em 1981; McLAUGHLIN; PEIKIN; BAILE, 1983; LIDDLE et al., 1984).

Um estudo com soja indicou expressivo aumento da bioatividade da CCK por meio do inibidor de tripsina (BRENNER; CORP; GIBBS, 1992). A liberação desse hormônio é um fator positivo para pessoas obesas, por interferir no consumo alimentar, sendo o inibidor de tripsina um aliado. Recentes estudos têm reforçado essas hipóteses correlacionando, também o inibidor de tripsina, com a saciedade em modelo animal (KOMARNYTSKY, COOK, RASKIN; 2011; NAKAJIMA et. al, 2011; CHEN et al., 2012). É importante lembrar que o amendoim possui inibidor de tripsina.

No entanto, as quantidades devem ser estabelecidas individualmente para que haja o papel funcional do amendoim e seus derivados e, dessa forma, não implicar em danos à saúde. Como já citado, atualmente já é comprovado que o consumo de amendoins nos lanches intermediários garante a saciedade por um período superior a duas horas e este fato inibe o consumo de outros lanches mais calóricos. Portanto, o consumo controlado de amendoins não só inibe o ganho de peso bem como aumenta a saciedade e a adesão ao plano de reeducação alimentar (MARCHIORI, 2011). Mas, não se sabe se todos os produtos derivados do amendoim, mesmo submetidos a tratamentos e processamentos, como, por exemplo a paçoca de amendoim, apresentam as mesmas características, composição e propriedades do amendoim, especialmente as relacionadas à saciedade, como já demonstrado pelo óleo e manteiga de amendoim.

## 2.2 INIBIDORES DE PROTEASES

Proteases, também denominadas peptidases (EC 3.4), são enzimas proteolíticas que catalisam a clivagem hidrolítica da ligação peptídica presente em proteínas e polipeptídeos, resultando em peptídeos menores ou aminoácidos (NEURATH, 1993).

De acordo com a reação catalisada, as enzimas proteolíticas estão divididas em dois grupos: as exopeptidases, que clivam um ou poucos resíduos de aminoácidos da extremidade N- ou C- terminal e as endopeptidases, que atuam em

ligações internas de cadeias polipeptídicas. Em relação à nomenclatura, o termo “proteínases” refere-se, apenas, às endopeptidases, enquanto que “proteases” e “peptidases” incluem, além das endopeptidases, as exopeptidases (BARRETT, 2001; FAN; WU, 2005 *apud* SANTOS et al, 2012.).

Os inibidores de proteases podem ser considerados, para os humanos, fatores antinutricionais e, quando presentes em alimentos, podem provocar efeitos fisiológicos adversos ou diminuir a biodisponibilidade de nutrientes. A maior questão sobre os riscos à saúde provocados por inibidores de proteases é o desconhecimento dos níveis de tolerância, do grau de variação do risco individual e da influência de fatores ambientais sobre a capacidade de detoxificação do organismo humano (SILVA, SILVA, 2000).

Inibidores de enzimas hidrolíticas são proteínas glicosiladas ou não (CAVALCANTI et al., 2002) de diferentes espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas. Entre as monocotiledôneas, as investigações foram dirigidas particularmente para os vegetais da família das gramíneas, atualmente denominada família Poaceae, tendo como principais representantes: arroz, cevada, milho, trigo, centeio e sorgo. Entre as dicotiledôneas, a família das solanáceas, representada pelo tomate, batata e tabaco, e a família das leguminosas (ou família Fabaceae), representada pelos feijões, soja, amendoim e ervilha, têm recebido especial atenção (BRZIN; KIDRIC, 1995; SCHULER et al., 1998; RICHARDSON, 1997).

Os níveis desses inibidores nos vegetais são variáveis e dependem do estágio de maturação, da sua localização nos tecidos, do tempo de colheita e de armazenamento, como, também, da variedade da planta, podendo coexistir diferentes classes de inibidores em um único tecido ou órgão (RYAN, 1990; RICHARDSON, 1997; BRZIN; KIDRIC, 1995), correspondendo de 1 a 10% do total de proteínas (USSUF; LAXMI; MITRA, 2001).

Os inibidores de proteínases de plantas são, primeiramente, classificados de acordo com a classe mecanística das enzimas que eles inibem. Dessa forma, são estabelecidas quatro classes de inibidores de proteínases: Inibidores de proteínases serínicas, cisteínicas, aspárticas e de metalo-proteínases, sendo os inibidores de proteínases serínicas os mais estudados (SANTOS et al., 2012). Muitos inibidores

de proteinases cisteínicas também foram caracterizados (BODE; HUBER, 1992; OLIVEIRA; XAVIER-FILHO, SALES, 2003), enquanto os inibidores de metalo-proteinases e de proteinases aspárticas são os estudados em menor escala. Esses inibidores são agrupados em famílias (Tabela 1), sendo a classe de inibidores de proteinases serínicas composta por sete subfamílias e as demais compreendem apenas uma família (BODE, HUBER, 1992; KOIWA; BRESSAN; HESEGAVA, 1997; MARGIS; REIS; VILLET, 1998). Os inibidores de proteinases serínicas são agrupados com base na similaridade de sequência primária, massa molecular, número de resíduos de cisteína e pontes dissulfeto (RICHARDSON, 1997; KOIWA; BRESSAN; HESEGAVA, 1997).

Tabela 01 - Classificação dos inibidores de proteases de plantas.

Proteases	Classes de inibidores			Famílias de inibidores
Serínicas	Inibidores de serínicas	de	proteinases	Bowman-Birk
				Kunitz
				Batata I
				Batata II
				Superfamília de Cereais
				Taumatina
				Ragi I-2/milho
Cisteínicas	Inibidores de cisteínicas	de	proteinases	Fitocistatinas
Aspárticas	Inibidores de aspárticas	de	proteinases	Inibidores de proteinases aspárticas
Metallo-proteinases	Inibidores de metalo-proteinases			Inibidores de carboxipeptidases A e B

Fonte: Ryan, (1990); Richardson, (1997).

Uma proteólise descontrolada e indesejada pode conduzir a muitos estados de enfermidade, incluindo enfisema, derrame cerebral, câncer, mal de Alzheimer, inflamação e artrite (POWERS, 2002). Além disso, a maioria das proteases é potencialmente prejudicial ao seu ambiente natural (BODE; HUBER, 1992) e, para limitar esses danos, tais moléculas devem ser estritamente controladas. O controle da atividade proteolítica se dá: (1) pela biossíntese destas enzimas sob a forma de precursores inativos, denominados zimogênios, cuja ativação dependerá de uma proteólise ou remoção de aminoácidos na porção N-terminal da molécula precursora; (2) pela regulação da expressão/secreção; (3) pelo bloqueio total ou diminuição da atividade catalítica sobre um determinado substrato por meio de

moléculas denominadas inibidores, que formam um complexo estequiométrico com a protease. Desta forma, diferente do estigma sobre sua propriedade antinutricional, os inibidores de proteases têm um potencial considerável para intervenção terapêutica numa variedade de patologias (POWERS, 2002). Devido à sua função de regulação das atividades proteolíticas, os inibidores de proteases são fundamentais na proteção de fluidos e tecidos, tais como soro sanguíneo, células pancreáticas e tecidos de reserva de plantas, contra sua degradação por proteólise (RYAN, 1990).

Na nutrição humana os inibidores de proteases são capazes de inibir as atividades da tripsina, quimotripsina, amilase e carboxipeptidase. Estudos (TUR-SINAI, 1972; NORIOKA, OMICHI, IKENARA, 1982; MALEKI et al., 2003; DODO et al., 2004) mostram a purificação de inibidores de tripsina e quimotripsina em sementes de amendoim (*Arachis hypogaea*) e há relatos de que inibidores de tripsina provocam redução no ganho de peso.

Mas, diferente das alegações de saúde atribuídas aos inibidores proteicos, para nutrição humana os inibidores de tripsina possuem estreita relação com ação antinutricional, provocando desnutrição proteica e alterações em órgãos envolvidos no processo digestivo como intestino e pâncreas (PEACE et al., 1991; BRUNE et al., 2010). No entanto, mesmo se apresentado como fator antinutricional, já tem sido demonstrada na literatura, que dependendo da dose, tempo de uso e diante de avaliações do seu efeito a partir de parâmetros bioquímicos e testes que garantam a digestão normal e conseqüentemente o aproveitamento proteico (ROY; SCHNEEMAN, 1981; SATO et al. 2002); esses inibidores de tripsina, tanto natural como sintético tem apresentado aplicações relacionadas de grande importância à saúde.

### 2.3 OBESIDADE

Como se sabe, a obesidade é um problema nutricional com influência socioeconômica, cultural e profissional que vem afetando a população mundial, numa prevalência de 10 a 50% entre adultos (FREZZA; WACHTEL; EWING, et al., 2006; BRASIL, 2011). Essa patologia tem aumentado sua incidência, não só nos países ricos como também nos países em desenvolvimento.

Em muitos países, tem sido verificada tendência no aumento do sobrepeso e da obesidade, e entre eles está o Brasil. Estudos identificaram um aumento de 53% na prevalência da obesidade quando comparada ao censo de 1974/1975 ao de 1989, indicando que o excesso alimentar está rapidamente se tornando um problema mais proeminente do que o déficit (COUTINHO, 1999).

A partir da Pesquisa de Orçamentos Familiares de 2008-2009 (POF) (IBGE, 2010), estimou-se, que cerca de 40% dos indivíduos adultos no Brasil, apresentavam excesso de peso, ou seja, IMC igual ou maior do que 25 kg/m<sup>2</sup>, sendo que 8,9% dos homens e 13,1% das mulheres estavam obesos. As maiores prevalências de obesidade foram encontradas nas regiões Sul e Sudeste (IBGE, 2010; WHO, 2004; AZAGURY; LAUTZ, 2011).

O mais recente levantamento realizado pelo Ministério da Saúde (2012) aponta que o excesso de peso e a obesidade continuam aumentando nos últimos anos no Brasil. De acordo com o estudo, a proporção de pessoas acima do peso no Brasil avançou de 42,7%, em 2006, para 48,5%, em 2011. No mesmo período, o percentual de obesos subiu de 11,4% para 15,8%. Sendo assim, a obesidade como uma doença epidêmica necessita de atenção e estudos para que se compreenda ainda melhor a sua fisiologia e conseqüentemente, se busquem tratamentos mais eficientes e efetivos (BRASIL, 2011).

As conseqüências da obesidade são: maior risco para morte prematura, aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis como a doença arterial coronariana, hipertensão arterial, diabetes mellitus tipo 2, osteopatias e algumas formas de câncer (MAHAN, ESCOTT-STUMP, 1998; ANGELIS, 2001), além de estar associada a diversas alterações deletérias no metabolismo lipídico, incluindo níveis elevados de colesterol total, LDL-colesterol e triglicérides, e redução do HDL-colesterol (VACANTI, 2004).

Devido a todas as conseqüências da obesidade, existe uma série de estudos visando a tratamentos que envolvem desde mudanças no estilo de vida, tratamentos não medicamentosos; tratamentos medicamentosos, até cirúrgicos. Dentre os mais diversos estudos, atualmente se têm buscado moléculas e/ou compostos que atuem como sacietogênicos. Alguns autores vêm mostrando que dietas com inibidor de

tripsina podem aumentar o nível plasmático de colecistocinina (NAKAJIMA et al., 2011; CHEN et al., 2012) se destacando como ferramenta promissora no tratamento da obesidade.

## 2.4 COLECISTOCININA

A colecistocinina foi descoberta em 1928 por Ivy e Oldberg, com base na capacidade dos sucos intestinais que estimulam a contração da vesícula. Em 1943, Harper e Raper, reconheceram que sucos semelhantes também estimulam a secreção de enzimas pancreáticas e propuseram um nome: pancreozimina. Anos depois, (DESCHENES et al., 1984), purificaram a sua forma ativa e sequenciaram seus aminoácidos adotando o termo colecistocinina (CCK).

A Figura 02 mostra as estruturas do gene do hormônio CCK, bem como o mRNA, com 345 nucleotídeos que codificam 115 aminoácidos, dos quais 20 resíduos constituem o peptídeo sinalizador, 25 o peptídeo espaçador, a CCK (58 resíduos) e uma extensão de 12 resíduos na região carboxi-terminal (LIDDLE, 1997).

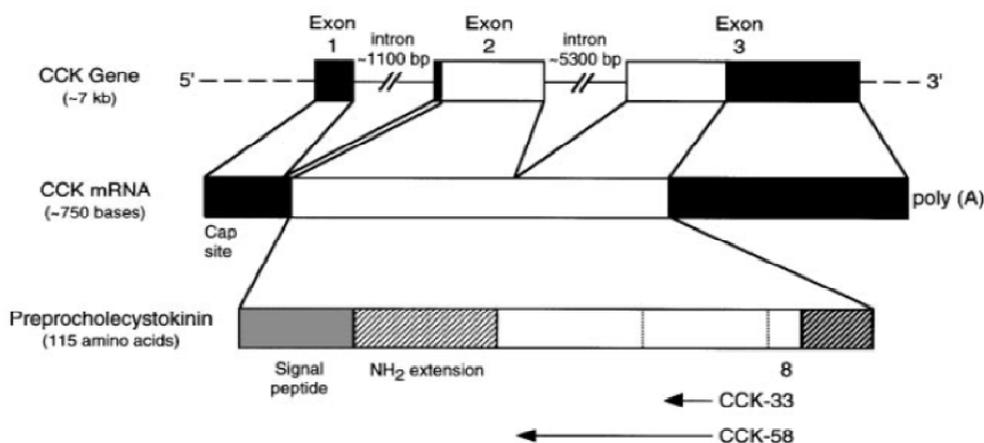


Figura 02 - Estrutura do Gene, DNA complementar e a forma pre-pro-Hormonal de colecistocinina (CCK).

**Fonte:** LIDDLE (1997).

Os genes isolados da CCK de camundongo, rato e humano revelam uma notável conservação, que consiste em 7 kilobases, contendo três exons, sendo o segundo e o terceiro os que codificam o pré-pró-peptídeo (LIDDLE, 1997).

O mRNA tem 750 bases e é expresso no cérebro e no intestino de animais em quantidades quase equivalentes. O mRNA é mais abundante no córtex cerebral, principalmente nas camadas II e III e no duodeno. No cérebro, a CCK é localizada com a dopamina nos neurônios e surgem no mesencéfalo e se projetam para prosencéfalo límbico, podendo também se projetar para o hipotálamo ventromedial, sendo assim de grande importância na regulação da saciedade. A CCK também atua no sistema nervoso periférico autônomo, podendo ser encontrada no plexo miontérico, submucosa, camadas musculares circulares do intestino delgado, cólon distal, no pâncreas, nas ilhotas de Langherans e no plexo celíaco no nervo vago (CRAWLEY; CORWIN, 1994).

Em ratos recém-nascidos, os níveis de mRNA estão relativamente altos no intestino e muito baixos no cérebro. Após 2 semanas de vida, os níveis de mRNA diminuem no intestino e aumentam no cérebro. A expressão do mRNA de CCK intestinal é modificada pela dieta, havendo um declínio em ratos em jejum ou em ratos alimentados com dietas que não estimulam a secreção de CCK. No entanto, algumas dietas (com nutrientes específicos) podem estimular o aumento da expressão de mRNA, intensificando assim a secreção de CCK (LIDDLE, 1997).

Espécies de variantes moleculares da sequência de aminoácidos de CCK têm sido identificadas em vários estudos. As sequências de 8 e 33 aminoácidos (C-terminal) foram demonstradas em porco, rato, galinha, chinchila, cachorro e no homem (BEINFELD; PALKOVITS, 1982). Também foram encontrados nesses, e em outros animais, sequências de 47 e 58 aminoácidos, (Figura 3) e todas elas conservam uma homologia estrutural, o octapéptideo sulfatado (C-terminal), Asp-Tyr(SO<sub>3</sub>H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>, parecendo ser a sequência mínima para a atividade biológica (CRAWLEY; CORWIN, 1994). Para a CCK funcionar como uma molécula ativa, ela tem de conter a sequência Trp-Asp-Met-Fen-NH<sub>2</sub>, no entanto essa sequência é idêntica a da terminação carboxílica da gastrina e não confere especificidade com a CCK. Para o peptídeo CCK ter afinidade com o seu receptor, ele necessita que seja estendido para 7 aminoácidos; dessa maneira, terá sua potência máxima alcançada quando a posição 7 do aminoácido tirosina for sulfatada na terminação carboxílica. Apesar de a sulfatação ser incomum em hormônios ela é

fundamental para a ação biológica da CCK, onde a forma não sulfatada é 1000 vezes menos ativa do que seu homólogo sulfatado (WILLIAMS, 1982).

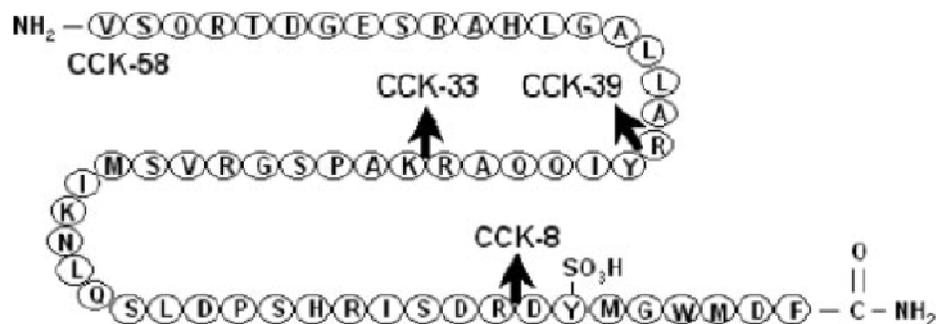


Figura 03 - Sequência aminoacídica do peptídeo colecistocinina (CCK).

**Fonte:** DUFRESNE; SEVA; FOURMY, (2006). SO<sub>3</sub>H: ácido sulfônico.

Receptores de CCK foram caracterizados em células dos ácinos pancreáticos, das Ilhotas de pâncreas e da vesícula biliar, esses receptores e foram chamados de CCK-A, no cérebro, a CCK e a gastrina se ligam com similaridade a esses receptores que se tornaram conhecidos por CCK-B (TURKELSON; REEVE; SOLOMON TE, 1990).

Como já citado, assim como em grande parte dos hormônios gastrointestinais, a CCK é produzida por células endócrinas intestinais, que estão concentradas, em sua maioria no duodeno e no jejuno proximal. Essas células endócrinas têm forma de balão e suas superfícies apicais ficam em contato com o lúmen intestinal (Figura 4). Na superfície basolateral das células intestinais se encontram os grânulos secretórios, com 250 nm de tamanho e contêm a CCK (SOLCIA et al., 1973; REHFELD et al., 1984). Essas células são chamadas de células I e, nelas, também são encontrados outros hormônios intestinais (BARDRAM; HILSTED; REHFELD, 1989).

Desta forma, nota-se que o alimento e outros fatores dentro do lúmen intestinal interagem com a superfície apical da célula de CCK, dando início ao processo de sinalização, resultando na secreção de CCK para o sangue a partir da superfície basal da célula. A Figura 4 ilustra os mecanismos de liberação da CCK por essas células. A ligação de peptídeos sinalizadores aos seus receptores na

célula I iniciam as cascatas de (a) ativação da fosfolipase C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ) com a geração subsequente de inositol trisfosfato (IP3), que promove a entrada de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), e de diacilglicerol (DAG), que ativa a proteína quinase C (PKC); (b) ativação da adenilatociclase (AC) com subsequente ativação da proteína quinase A (PKA); ou, ainda, (c) de uma via desconhecida, que pode estar envolvida na ativação dos canais de cálcio, que parece ser importante para a ocorrência da secreção de CCK. A localização celular dos receptores de ligantes para liberação da CCK pode ser tanto na região basolateral, para o peptídeo liberador de gastrina (GRP), como na luminal, para o fator liberador de CCK luminal (LCRF) e o peptídeo monitor, entre outros, que estão localizados tanto no intestino como nos nervos entéricos. A entrada de cálcio na célula pode ser afetada também por vários mensageiros secundários (LIDDLE, 1997).

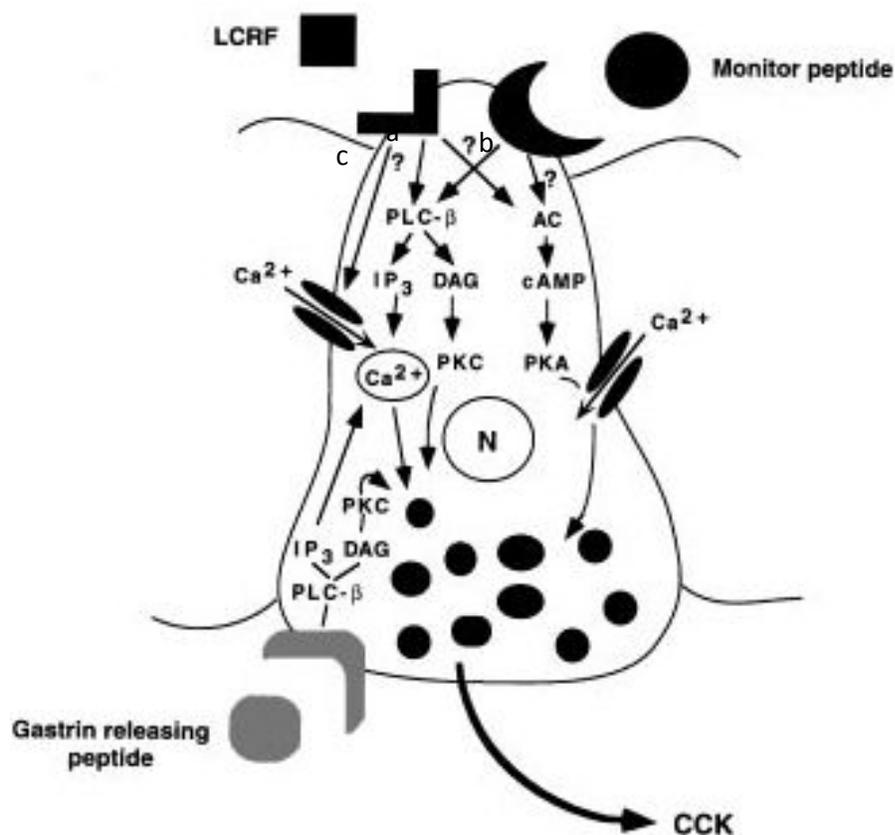


Figura 04 - Modelo de sinalização intracelular de secreção de colecistocinina (CCK).

Fonte: Liddle (1997).

Peptídeos sinalizadores, ao se ligarem aos receptores de CCK na célula iniciam as cascatas de adenil ciclase e fosfatidilinositol: (a) Ativação da fosfolipase C-β (PLC-β) com a geração subsequente de Inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), e diacilglicerol (DAG) e os aumentos subsequentes de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) e ativação da proteína quinase (PKC) respectivamente. (b) a ativação da adenilato ciclase (AC) com subsequente elevação das concentrações da PKA ou (c) com uma via ainda desconhecida, que pode estar envolvida pela ativação dos canais de cálcio que parece ser importante para a ocorrência da secreção de CCK. As possíveis localizações dos receptores de CCK na célula pode ser tanto na região basolateral (GRP) como na luminal, sendo eles o fator liberador de CCK luminal (LCRF), o peptídeo monitor entre outros, que estão localizados tanto no intestino como nos nervos entéricos. A entrada de cálcio podem ser afetada também por vários mensageiros secundários. PLC-β, fosfolipase C-β; IP<sub>3</sub>, inositol trifosfato; DAG, diacilglicerol; PKC, proteína quinase C; AC, adenilato ciclase; PKA, proteína quinase A; GRP, peptídeo liberador de gastrina; LCRF, fator liberador de CCK luminal (LIDDLE, 1997)

### 2.4.1 Mecanismo da Saciedade: Inibidores de Tripsina x Colecistocinina

O provável mecanismo que explica o aumento da CCK pela consumo de alimentos rico em inibidores de tripsina se dá por um complexo efeito de *feedbacks* (negativo e positivo) (BLOOM, 2006). Dentre muitos fatores que estimulam a liberação de CCK, estão os alimentos (proteínas e lipídios) e alguns peptídeos já purificados e encontrados no lúmen intestinal, como o inibidor da ligação do diazepam (DBI), o fator liberador de CCK luminal (LCRF) e o peptídeo monitor (KARL-HEINZ, 1998) (Figura 5).

O DBI é um fator de liberação de CCK que já foi isolado e sequenciado da mucosa intestinal de porco, consistindo em 86 aminoácidos e uma massa molecular de 9810 Da. A infusão de DBI intraduodenal sintético em ratos e porcos estimulou significativamente a liberação de CCK e amilase pancreática. Além disso foram encontrados resultados de estimulação de CCK com fragmentos do DBI, sendo que 100 vezes menos potente do que o peptídeo inteiro (LIDDLE, 1997).

O LCRF também é um peptídeo de liberação de CCK e foi isolado a partir de secreções intestinais de ratos. O peptídeo tem uma massa de 8136 Da e é composto de 70-75 aminoácidos. Ele exibe uma expressiva diferença na composição de aminoácidos, comparado ao DBI, não tendo nenhuma homologia. Em contraste com o DBI, que contém 13 lisinas e dois resíduos de arginina e que representam locais de clivagem para a tripsina, o LCRF tem apenas uma lisina e um resíduo de arginina, portanto tornando-o menos degradável pela clivagem da tripsina (KARL-HEINZ, 1998; LIDDLE, 1997).

Um peptídeo secretado junto ao suco pancreático, chamado de peptídeo monitor, foi purificado e sequenciado, revelando conter 61 aminoácidos que exibem homologia com a família dos inibidores de tripsina. Apesar de ser um membro da família dos inibidores de protease, esse peptídeo monitor estimula a liberação de CCK (NAKAJIMA et al., 2011).

Esses fatores de liberação da CCK são degradados em situação basal, favorecendo níveis basais de liberação de CCK no sangue, mas em condições pós-prandial, com a presença de alimentos ou inibidores de proteases no lúmen

intestinal, há conseqüentemente uma maior concentração de tripsina no lúmen, e uma menor hidrólise dos fatores de liberação da CCK (DBI, LCRF e peptídeo monitor). Assim, eles favorecem uma maior liberação de CCK nas células I (NAKAJIMA et al., 2011).

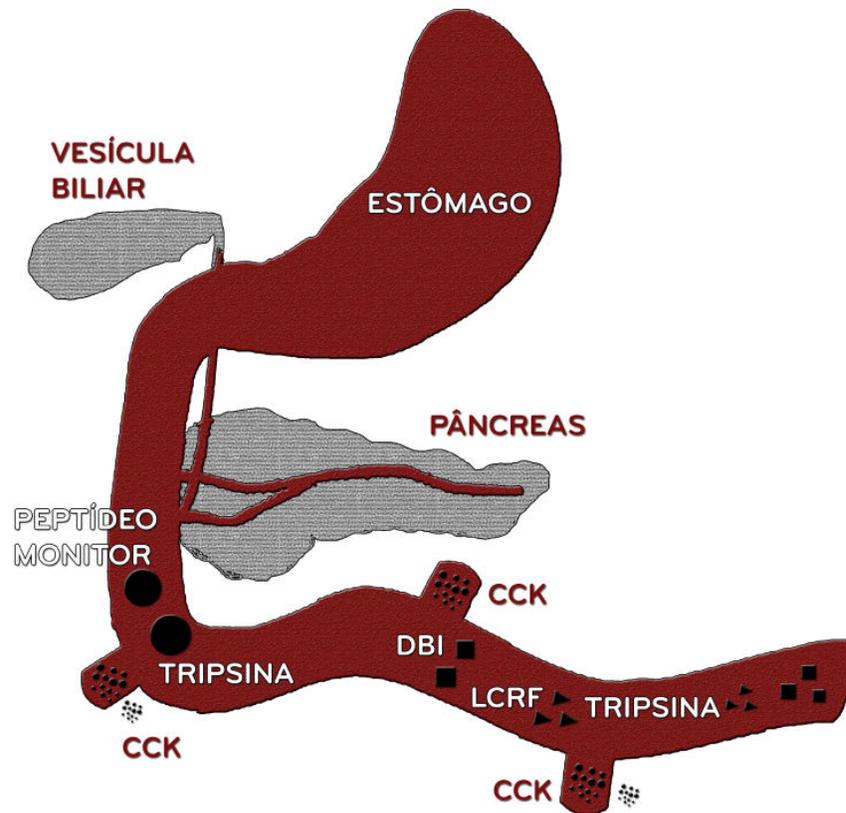


Figura 05 - Modelo proposto do papel do inibidor da ligação do diazepam (DBI), do fator liberador de CCK luminal (LCRF) e o peptídeo monitor na regulação da secreção de colecistocinina (CCK).

Fonte: Karl-Heinz (1998).

DBI e LCRF são secretados pelas células epiteliais do pequeno intestino proximal para o lado luminal de uma forma parácrina. O peptídeo monitor é liberado pelo pâncreas. Os fatores de liberação de CCK DBI, LCRF e peptídeo monitor, no momento pós-prandial, diminuem as suas atividades devido à atividade proteolítica da tripsina.

Na presença de inibidores de protease, ocorre um aumento considerável de fatores de liberação de CCK (DBI, LCRF e peptídeo monitor), quando comparado com as formas basal ou pós-prandial. Esse aumento dos fatores de liberação desencadeiam uma sinalização ao se ligar aos receptores da células I, estimulando assim a secreção de CCK (LYMAN; LEPKOVSKY, 1957; FOLSCH et al., 1987; HILL et al., 1990; GARTHOFF et al., 2002; KOMARNYTSKY; COOK; RASKIN, 2011; NAKAJIMA et al, 2011; CHEN et al., 2012).

Dessa forma, este estudo objetiva avaliar a influência do inibidor de tripsina de paçoca de amendoim sobre a redução do ganho de peso em camundongos *swiss* e ratos *wistar* e almeja-se que esta pesquisa possa provocar discussões sobre o papel de novas moléculas na saciedade e no ganho ponderal.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de um novo inibidor de tripsina de paçoca de amendoim sobre a saciedade e alterações bioquímicas e histomorfológicas em camundongos *swiss* e ratos *wistar*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o ganho de peso em camundongos *swiss* submetidos à dieta hipercalórica rica em paçoca de amendoim.
- Avaliar o consumo alimentar em camundongos *swiss* submetidos à dieta hipercalórica rica em paçoca de amendoim.
- Avaliar parâmetros bioquímicos em camundongos *swiss* submetidos à dieta hipercalórica rica em paçoca de amendoim.
- Avaliar os efeitos morfofisiológicos em órgãos de camundongos *swiss* submetidos à dieta hipercalórica rica em paçoca de amendoim.
- Purificar o inibidor de tripsina da paçoca de amendoim a partir de seu extrato proteico.
- Caracterizar o inibidor quanto à estabilidade a agentes desnaturantes (pH e, temperatura).
- Analisar a massa molecular.
- Caracterizar os parâmetros de especificidade ( $IC_{50}$  e  $K_i$ ) do inibidor de tripsina presente em paçoca de amendoim para a tripsina.
- Avaliar o ganho de peso ratos *wistar* submetidos à dieta com inibidor de tripsina.
- Avaliar o consumo alimentar em ratos *wistar* submetidos à dieta com inibidor de tripsina.
- Avaliar a digestibilidade proteica em ratos *wistar*.
- Avaliar parâmetros bioquímicos em ratos *wistar* submetidos à dieta com inibidor de tripsina.
- Avaliar o nível plasmático de CCK em ratos *wistar* submetidos à dieta com inibidor de tripsina.

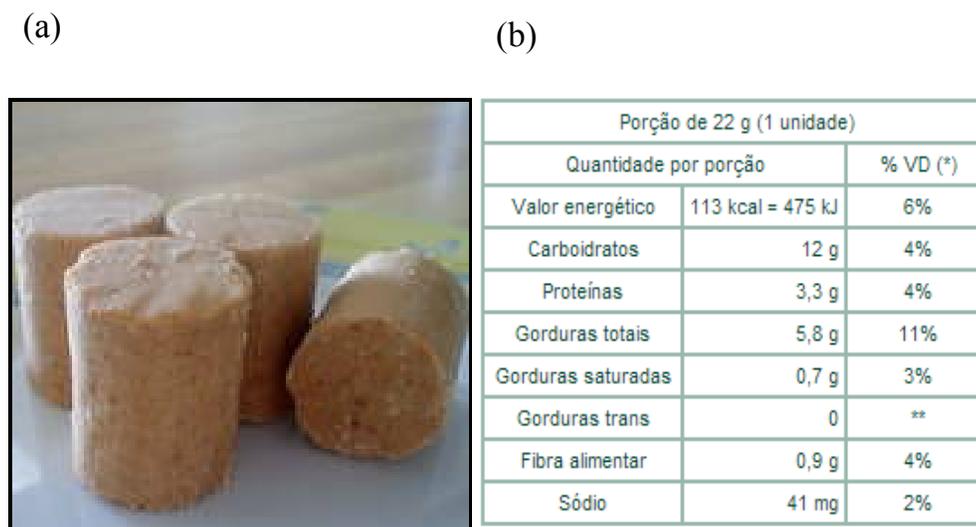
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Paçoca de Amendoim

As paçocas foram compradas em estabelecimentos comerciais locais da cidade do Natal, RN (Brasil), tendo sido sempre analisadas as paçocas de amendoim da mesma marca.

Figura 06 - (a) Paçoca de amendoim (b) Composição Nutricional da paçoca de amendoim



**Fonte:** Arquivo pessoal e Rótulo do produto.

#### 4.1.2 Animais

Camundongos *swiss* machos com dois meses de idade e pesando entre 30–35 g e ratos *wistar* machos com dois meses, pesando entre 150–200 g foram obtidos no biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e Universidade Potiguar (UnP), respectivamente. Os animais foram ambientados em gaiolas coletivas com, no máximo, cinco animais por gaiola e mantidos em fotoperíodo de 12/12 horas, à temperatura de  $25 \pm 2$  °C e umidade entre 45 e 55%, com acesso à água e alimentos *ad libitum*.

O protocolo experimental desta pesquisa foi submetido à Comissão de Ética no uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN. Para o desenvolvimento de tal protocolo (n° 021/2011) foram adotados os princípios éticos e os procedimentos de acordo com o Guia Padrão de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório (1996). Este estudo foi efetivado no Laboratório de Química e Funções de Proteínas Bioativas da UFRN, no Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRN e no biotério da UnP. Os resíduos gerados durante os procedimentos foram descartados de acordo com (RDC 33/2003).

#### **4.1.3 Enzimas, substratos e reagentes**

##### Enzimas

- Quimotripsina (Sigma-Co)
- Tripsina (Sigma-Co)

##### Substrato

- Azocaseína 1% (Sigma-Co)
- Bapna (N- $\alpha$ -benzoil-arginina-p-nitroanilida / Sigma-Co)

##### Reagentes

- Dimetilformamida (Sigma-Co)
- Albumina sérica bovina - BSA (Sigma-Co)
- DMSO (dimetilsulfóxido/BDH GPR)
- SDS (dodecil sulfato de sódio - Reagen)
- Acrilamida e N'N'-metilenobisacrilamida (Sigma-Co)
- TEMED – N, N, N',N'-tetrametiletilinodiamino – (Sigma-Co)
- Padrões de peso moleculares para eletroforese (Fermantas life sciences)
- Coomassie Blue G-250 e R-250 (Sigma-Co)
- Imunoenssay CCK (Phoenix Pharmaceuticals, Inc)
- Labtest Diagnóstica S.A.®

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

#### 4.1.4 Equipamentos

- Sistema de cromatografia líquida AKTA purifier (GE)
- Espectrofotômetro HITACHI U-2000
- Banho-Maria (Tecnal - Te 056)
- Balança analítica eletrônica – SCIENTECH AS 210
- Micro centrífuga eppendorf 5410
- Centrífuga HITACHI CR 21
- Bomba Pump-1 Amersham Biosciences
- Liofilizador Tecnal L108
- Purificador de água Milli-Q® Water System da Millipore Corp. (Bedford, MA, USA)
- Leitor de Elisa Ephot 2.0

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Fases do Delineamento Experimental

Foram efetivados três experimentos com animais para o desenvolvimento das metodologias *in vivo* descritas, tendo como objetivo responder as perguntas relacionadas ao efeito do AHTI no ganho de peso, consumo alimentar, saciedade e alterações sobre parâmetros bioquímicos, histomorfológicas e níveis de CCK, visto no esquema abaixo (Figura 07).

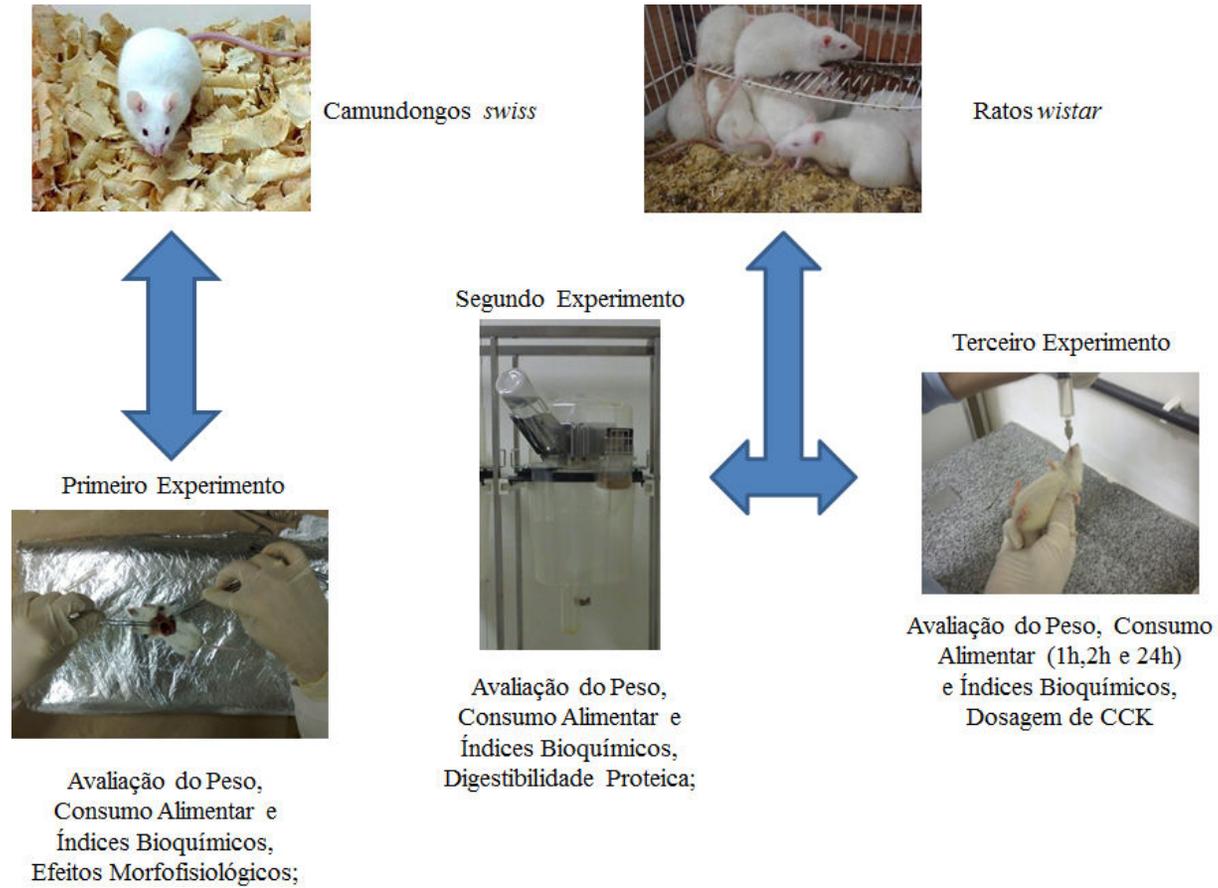


Figura 07 - Fases do delineamento experimental com os animais

Fonte: Arquivo pessoal.

#### 4.2.2 Avaliação do ganho de peso e consumo alimentar em camundongos *swiss* submetidos à dieta hipercalórica rica em paçoca de amendoim (Primeiro experimento)

##### 4.2.2.1 dietas

As dietas experimentais para os camundongos seguiram as especificações do guia *Nutrient requirements of the laboratory rat*. A dieta padrão (DP) utilizada foi a comercial Labina. A dieta hipercalórica (DH) padronizada neste experimento foi composta por uma mistura de farinha de ração comercial Labina e o alimento industrializado, paçoca de amendoim, na proporção de 30% de ração Labina para 70% de paçoca de amendoim, como demonstrado na Tabela 02. Para a análise da composição centesimal foram adicionados ao programa Diet Pro® as informações nutricionais contidas nos rótulos da ração Labina e da paçoca de amendoim, seguindo as regras estabelecidas e as exigências Brasileiras determinadas pela ANVISA (Agência nacional de vigilância nutricional) Resolução - RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003 e RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003 (BRASIL, 2003).

Tabela 02 - Composição centesimal e percentual de contribuição dos macronutrientes em 100 g das dietas padrão (DP) e hipercalórica (DH) de acordo com o programa Diet Pro®.

Variáveis	Dietas			
	DP		DH	
Energia (Kcal)	350		454	
Proteína (g)	22	22%	15	15%
Lipídios (g)	6	6%	18	18%
Carboidratos (g)	52	52%	58	58%
Cinzas (g)	11	11%	4	4%
Umidade (g)	9	9%	5	5%
<b>Total (g)</b>	<b>100</b>		<b>100</b>	

Fonte: Arquivo pessoal

DP (ração Labina)

DH (ração Labina e paçoca de amendoim 1:7).

#### 4.2.2.2 Animais

Após 6 dias de adaptação, os camundongos foram distribuídos casualmente em dois lotes tratados por 90 dias (14 semanas) com dieta padrão (DP), denominado grupo padrão (GP; n = 08) ou com dieta hipercalórica (DH), denominado grupo teste (GT; n = 08).

##### 4.2.2.1.1 Consumo alimentar

Depois de estabelecido o padrão de consumo alimentar habitual de cada animal (quanto cada camundongo consome) durante os 6 dias de adaptação, os animais foram submetidos aos testes com as dietas e avaliados quanto ao consumo alimentar em balança calibrada. Dessa forma, foi obtida, semanalmente a diferença entre a dieta fornecida (antes do consumo) e a dieta consumida: Consumo Alimentar por semana (g) = Dieta Fornecida – Dieta consumida e o resultado foi expresso feita a média do consumo alimentar, por semana, por grupo (g), de 14 semanas, considerado o padrão de consumo alimentar habitual individual dos animais.

O consumo das dietas e de água e o ganho de peso dos animais foram monitorados diariamente.

##### 4.2.2.1.2 Evolução do peso corporal

Os camundongos foram pesados individualmente em balança calibrada, uma vez por semana por um período de 14 semanas. Dessa forma, foi feita a média de peso (g) por semana, por grupo, de 14 semanas.

##### 4.2.2.1.3 Eficiência alimentar

Com a finalidade de analisar a capacidade de o animal converter a energia alimentar consumida em peso corporal, foi efetivado o cálculo da eficiência alimentar (EA). Esse cálculo foi obtido dividindo-se o ganho de peso (g) médio semanal dos animais de cada grupo pelo total de energia ingerida (kcal) média semanal também de cada grupo, multiplicando por 100 (WHO, 2004). A energia ingerida foi calculada multiplicando-se a quantidade consumida de alimento semanalmente por cada grupo

pelo valor calórico de cada dieta. Os resultados foram expressos com a média de cada grupo durante as 14 semanas.

#### **4.2.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos em camundongos *swiss* submetidos à dieta hipercalórica rica em paçoca de amendoim (Primeiro experimento)**

Ao término dos testes com as dietas, depois de 14 semanas, os 16 camundongos (8 GP, 8 GT) foram colocados em jejum por 12 a 15 horas, anestesiados com xilazina 2% e quetamina 5% e eutanasiados. O sangue foi coletado por punção cardíaca e armazenado em tubos Falcon com anticoagulante EDTA. O soro foi separado por centrifugação a 3000 x *g* por 10 minutos e utilizado para as determinações de glicose (GL), de triglicerídeos (TG), de colesterol total (COL), de lipoproteínas de alta-densidade (HDL) e de lipoproteínas de baixa-densidade (LDL). O método empregado nas dosagens foi o enzimático-colorimétrico (Kit CELM®, São Paulo, Brasil). As lipoproteínas de baixa (LDL) foram calculadas segundo a fórmula de Friedwald, 1972,  $LDL = COL - (HDL + VLDL)$ , sendo  $VLDL = \text{triacilglicerol} / 5$ , quando TG menor ou igual a 400 mg/dL. Nas concentrações de TG superiores a 400 mg/dL, as concentrações de VLDL foram estimadas pelo valor médio do grupo em questão. As leituras colorimétricas foram realizadas em espectrofotômetro.

Amostras sanguíneas também foram submetidas a ensaios enzimáticos para transaminase glutâmica pirúvica (TGP) e transaminase glutâmica oxalacética (TGO) (Labtest diagnostic kit transferases).

Os resultados foram avaliados considerando como referência os valores do grupo controle, entretanto esses valores encontram-se dentro dos intervalos normais estabelecidos para camundongos *swiss* em outros biotérios citado na literatura (SPINELLI et al., 2012).

#### **4.2.4 Avaliação dos efeitos morfofisiológicos em pâncreas de camundongos *swiss* submetidos à dieta hipercalórica rica em paçoca de amendoim (Primeiro experimento)**

Nos 16 camundongos (8 GP e 8 GT) anestesiados com xilazina 2% e quetamina 5% e eutanasiados, a cavidade tóraco-abdominal foi aberta e, na sequência, ocorreu a retirada do pâncreas, que foi lavado em solução salina, seco em papel absorvente adequado e pesado. Os dados dos pesos do animal e do órgão foram utilizados para os cálculos de peso absoluto e relativo do órgão, contribuindo para a sua caracterização macroscópica e os resultados foram expressos pela média dos pesos dos pâncreas obtidos por grupo. Depois de o pâncreas ser avaliado macroscopicamente e pesado, fragmentos foram retirados do órgão e fixados por imersão em formol tamponado a 10%. Durante o processamento, os fragmentos foram desidratados com etanol, diafanizados em xilol e impregnados e emblocados em parafina. Os cortes histológicos foram preparados por microtomia, a 4  $\mu\text{m}$ , e corados pela técnica de rotina da Hematoxilina-Eosina (HE). A análise histológica dos fragmentos ocorreu escolhendo-se aleatoriamente três cortes, os quais foram fixados em lâminas previamente preparadas com organossilano.

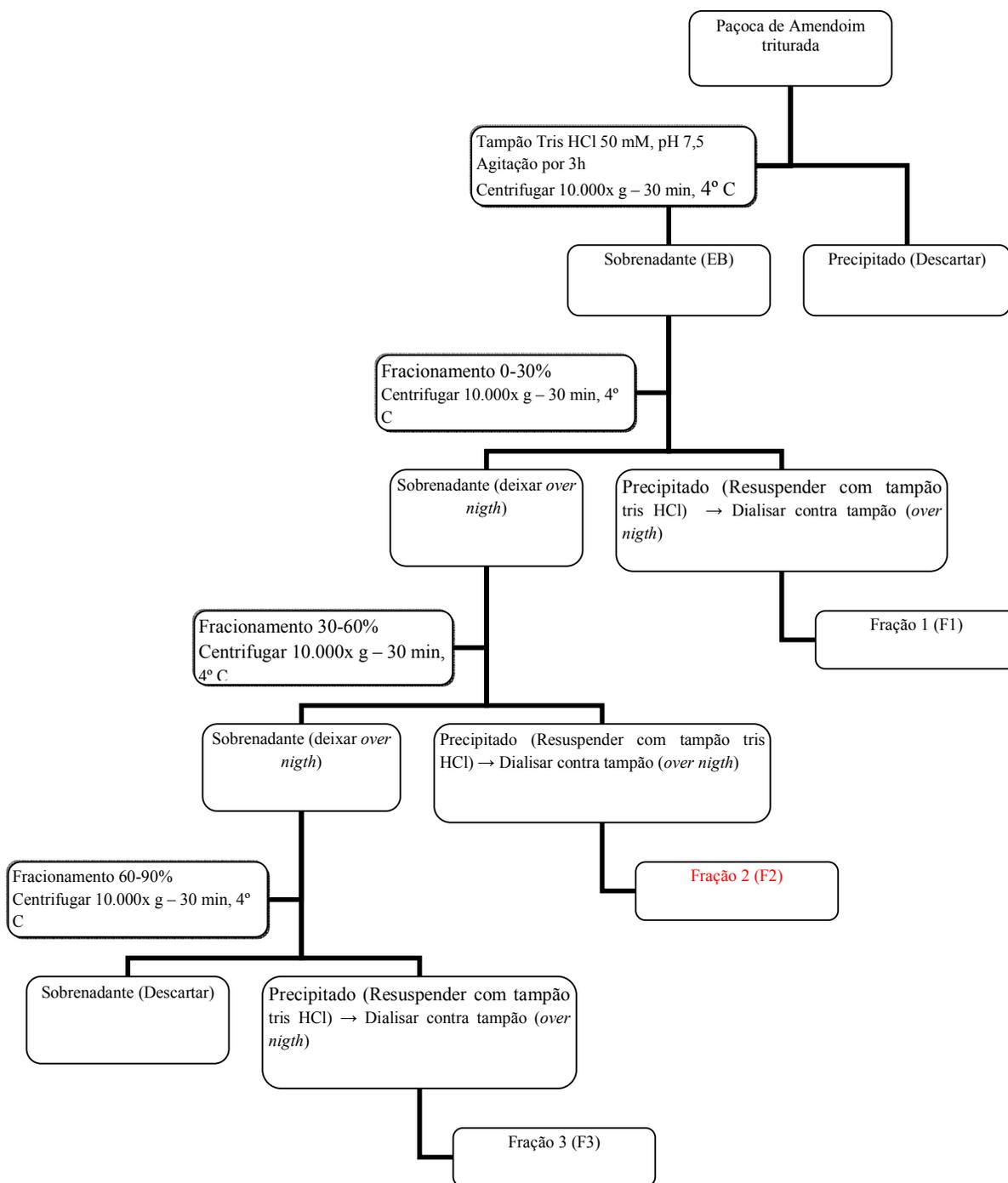
#### **4.2.5 Obtenção do extrato bruto e fracionamento proteico da paçoca de amendoim**

As paçocas de amendoim foram maceradas em moinho refrigerado (6 °C) até a formação de uma farinha de granulação fina (40 mesh). As proteínas totais dessa farinha foram extraídas em tampão Tris HCl 50 mM, pH 7,5, na proporção de 1:10 (p/v). A mistura foi submetida à agitação constante, por 3 horas à temperatura ambiente. Decorrido o tempo, o material foi centrifugado a 12.000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi denominado extrato bruto (EB) e o precipitado foi denominado PEB.

O extrato bruto foi fracionado por meio da precipitação sequencial com sulfato de amônio nas faixas de saturação de 0-30% (F1), 30-60% (F2), e 60-90% (F3). Na sequência, cada fração foi mantida por cerca de 12 h a 8 °C e centrifugada a 12.000 x g por 30 min, a 4 °C para obtenção das proteínas precipitadas. Os precipitados

foram ressuspensos em tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5, dialisados contra o mesmo tampão, e mantidos a -20 °C até a realização dos experimentos (Figura 08).

Figura 08 - Esquema de extração e fracionamento proteico com sulfato de amônio em três percentuais de saturação da paçoca de amendoim.



Fonte: Arquivo pessoal

#### **4.2.6 Obtenção do retido em tripsina da F2 por cromatografia de afinidade em matriz de tripsina-sepharose 4B**

A fração 2 (F2), obtida da precipitação com sulfato de amônio, apresentou a maior atividade antitriptica, sendo, por isso, escolhida para dar continuidade nas etapas de purificação proteica. Cerca de 60 mg da F2 (30-60%), foram aplicados a uma coluna cromatográfica de afinidade de Tripsina-Sepharose 4B (10 cm X 1,5 cm) em tampão Tris-HCL 50 mM, pH 7,5. As proteínas adsorvidas na matriz foram eluídas com solução de HCl 5 mM e coletadas em alíquotas de 3 mL a um fluxo de 2 mL/min. O perfil proteico foi acompanhado por espectrofotometria a 280 nm. O pico retido e eluído da matriz de afinidade foi dialisado contra tampão Tris-HCL 50 mM, pH 7,5, liofilizado e denominado de AHTI.

#### **4.2.7 Avaliação do grau de pureza e determinação da massa molecular dos inibidores proteicos**

Com o intuito de determinar o grau de pureza e a massa molecular, EB, FE e AHTI, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% em presença de SDS, de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). Foram utilizadas placas de vidro de dimensões 10x14 cm, espaçadores de 0,75 mm e solução estoque de acrilamida/bisacrilamida na proporção de 30:2 dissolvidas em água destilada para o volume de 100 mL. Essa solução foi filtrada em papel de filtro Whatman nº 1 e estocada em frascos escuros a 5 °C. O gel de separação foi preparado numa concentração de 20% contendo: 0,372 mL de água destilada, 1,25 de tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 50 µL de SDS 10%, 3,3 mL de solução estoque de acrilamida/bisacrilamida, 25 µL de persulfato de amônio e 3,0 µL de Temed concentrado. O gel de concentração foi preparado com 1,5 mL de água destilada; 0,625 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 6,8; 25 µL de SDS 10%; 0,33 mL de solução estoque de acrilamida/bisacrilamida; 12,5 µL de persulfato de amônio e 2,5 µL de Temed concentrado. Às amostras foi adicionado tampão de amostra constituído em Tris-HCl 62,5 mM; SDS 2%; glicerol 10% v/v; 0,01% de azul de bromofenol e 5% β-mercaptoetanol. O tampão de corrida consistia de Tris  $2,5 \times 10^{-2}$  M; glicina  $1,92 \times 10^{-1}$  mM e SDS 10%. Alíquotas contendo cerca de 15 µg de AHTI em tampão de amostra Tris-HCl  $6,25 \times 10^{-2}$  M, SDS 2%, glicerol 10% v/v, 0,01% de azul de bromofenol foi aplicada no gel, o qual foi submetido a uma corrente constante de 20 mA por,

aproximadamente, 2 horas. Quando o marcador de corrida (azul de bromofenol) atingiu o final do gel, a eletroforese foi finalizada. Após a eletroforese, as proteínas foram detectadas por coloração segundo procedimento descrito por Weber e Osborne (1969). Para isso, o gel foi submerso em solução fixadora, composta por 25 ml de água destilada, 5 ml de ácido acético 10% e 30 ml de etanol 30%, passados 30 minutos retirado da solução fixadora e colocado *over night* em solução corante de comassie coloidal composto por 10 ml de metanol e 40 ml de *Coomassie* blue R250. O marcador de peso molecular utilizado foi o Fermentas Invitrogen® (com pesos de 230, 130, 96, 72, 56, 36, 28, 17 KDa).

#### **4.2.8 Determinações de proteínas solúveis**

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. A leitura de quantificação proteica foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm. Os resultados foram expressos em µg de proteínas solúveis/µL e utilizados para o cálculo da atividade específica expressa em UI (unidade inibição)/µg de proteínas solúveis.

#### **4.2.9 Atividades antitriptica do extrato e frações proteicas determinações de proteínas solúveis**

As atividades antitripticas do PEB, EB, F1, F2, F3 e AHTI foram determinadas utilizando a seguinte metodologia: alíquota de 20 µL da solução de tripsina bovina (0,3 mg/ml HCl 2,5 mM) foram pré-incubada com 560 µL de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, 120 µL de HCl 2,5 mM e 100 µL de EB, F1, F2 ou F3 e 20 µL de AHTI por 15 minutos a 37°C. Após esse período, a reação foi iniciada adicionando-se 500 µL de solução de substrato específico (BApNA 1,25 mM). A reação processou-se por mais 10 minutos, nas mesmas condições de incubação, e, em seguida, foi interrompida adicionando-se 120 µL de solução de ácido acético 30%. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas e provas em branco foram realizadas. A absorbância foi medida a 410 nm. Os resultados foram expressos em UI/µg de proteínas solúveis. A UI foi definida como a quantidade de inibidor capaz de diminuir em 0,01 nm o valor de absorbância no ensaio antitriptico.

#### **4.2.10 Estabilidade do AHTI em variações de temperaturas e pHs**

Para avaliar a estabilidade térmica de AHTI seguiu-se a metodologia como descrita por Gomes et al. (2005), na qual alíquotas de 85  $\mu$ L do inibidor foram incubadas por 30 minutos, a 40 °C, 60 °C, 80 °C e 100 °C. Decorridos os tempos de incubação, as amostras foram resfriadas a 4 °C e então alíquotas contendo 10  $\mu$ g (0.30 nM) do inibidor foram utilizadas no ensaio de atividade inibitória sobre a tripsina como descrito no item 3.3.8. Os ensaios foram realizados em triplicata e provas em branco em duplicatas foram efetivadas.

Para avaliar a estabilidade do AHTI após tratamento em diferentes pHs, seguiu-se a metodologia como descrita em Gomes et al., (2005), na qual alíquotas de 2,5 mL do inibidor foram dialisadas contra o tampão com o pH desejado por 16 horas. Esses tampões são: para pH 2-4, glicina-HCl; para pH 5-8, fosfato de sódio monobásico; para pH 9-12, glicina-NaOH, nos quais a concentração de soluto foi de 100 mM. Após 1 h de incubação a 37°C nos referidos tampões, as amostras foram dialisadas por 4h, em Tris HCl 50 mM, pH 7,5, para ajuste ao pH do ensaio. Os ensaios de atividade inibitória para tripsina foram feitos em triplicata utilizando-se 10  $\mu$ g (0.3 nM) do inibidor como descritos no item 3.3.8. Provas em branco também foram realizadas.

#### **4.2.11 Propriedades inibitórias e determinação da constante de inibição**

##### 4.3.11.1 Determinação da IC<sub>50</sub> para tripsina

A concentração de AHTI que inibe 50% da atividade (IC<sub>50</sub>) da tripsina foi determinada pela construção de uma curva de inibição que relaciona o percentual de inibição da tripsina e concentração de AHTI. Para a construção dessa curva, concentrações crescentes de inibidor (0; 1,84; 3,68; 7,35; 11; 14,71; 29,41 e 58,82 nM) foram adicionadas com alíquotas de 10  $\mu$ L (0,4  $\mu$ g = 0.012 nM) de enzima e o ensaio ocorreu como descrito no item 3.3.8. O percentual de inibição da atividade da tripsina para cada concentração de inibidor foi utilizada na construção de uma curva de inibição e determinação da IC<sub>50</sub>.

#### 4.2.11.2 Determinação da constante de inibição e do mecanismo de inibição para tripsina

Para determinar o mecanismo de inibição e a constante de inibição ( $K_i$ ), foi construído o gráfico de acordo com Dixon et al. (1979), onde o eixo das abscissas (X) corresponde às concentrações crescentes de AHTI (0; 1,84; 3,68; 7,35; 11; 14,71; 29,41 e 58,82 nM) e o eixo das ordenadas (Y) corresponde ao inverso dos valores da velocidade máxima.

O ensaio enzimático com tripsina para a determinação do  $K_i$  foi efetivado na presença de duas concentrações de BApNA ( $1,25 \times 10^{-3}$  e  $6.25 \times 10^{-4}$  M). Os ensaios ocorreram como descritos no item 3.3.8.

#### 4.2.12 Avaliação do ganho de peso e consumo alimentar em ratos *wistar* submetidos à dieta com inibidor de tripsina (Segundo experimento)

##### 4.2.12.1 Dietas

As dietas experimentais para os ratos seguiram as recomendações da AIN-93G de acordo com Reves et al., (1993), tendo sido utilizada a dieta Padrão AIN-93G (S), dieta aproteica (NP), dieta teste 1 (PA, 70% de paçoca de amendoim) e dieta teste 2 (AHTI, dieta Padrão AIN-93G suplementada por gavagem com 50 mg/kg de AHTI), apresentadas na Tabela 3. Para melhor controle foi formado um grupo com dieta AIN-93G com água por gavagem (PG; n=06), a fim de determinar a influência do procedimento de gavagem. Todas as dietas AIN-93G foram oferecidas pela via oral, sendo administrada por gavagem o inibidor AHTI e a água para o grupo PG.

Tabela 03 - Composições das dietas experimentais utilizadas para os ratos *wistar* no experimento de digestibilidade proteica.

	g/Kg de ração			
	Dieta Padrão (S)	Dieta Aproteica (NP)	Dieta Teste 1 (PA)	Dieta Teste 2 (AHTI)
Inibidor de tripsina de paçoca de amendoim (AHTI)	-	-	-	50

Paçoca de Amendoim (PA)	-	-	160	-
Caseína	100	-	40	100
Celulose	50	50	50	50
Sacarose	100	100	-	100
Mix de Minerais	35	35	35	35
Mix de Vitaminas	10	10	10	10
L-Cistina	1,8	-	1,8	1,8
Terc Butil-hidroquinona	0,008	0,008	0,008	0,008
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Óleo de soja	40	40	40	40
Amido	397.486	397.486	397.486	397,7

Fonte: Arquivo pessoal

#### 4.2.12.2 Animais

Para avaliação dos efeitos da administração do AHTI foram criados 5 grupos de ratos *wistar* (n= 6). Depois de 3 dias de adaptação, seguindo as recomendações de Sgarbieri (1979) com algumas modificações, os ratos foram distribuídos individual e casualmente em 5 lotes em gaiolas metabólicas e tratados com as dietas descritas no item 4.2.12.1, oferecidas durante 11 dias, totalizando 14 dias de experimento.

O consumo das dietas e de água foi controlado diariamente, assim como o ganho de peso por animal. As fezes e urinas de cada animal foram coletadas, identificadas e mantidas em freezer para posterior análise.

#### 4.2.13 Avaliação da digestibilidade proteica em ratos *wistar* (Segundo experimento)

Para a determinação da digestibilidade, as dietas foram oferecidas aos 30 ratos (S, NP, PA, AHTI, PG) em gaiolas metabólicas. As fezes foram coletadas, considerando o período adaptação, no 4<sup>o</sup>, 8<sup>o</sup>, e 14<sup>o</sup> dias, final do experimento em recipientes individuais, e mantidas sob refrigeração.

Ao término, as fezes foram secas em estufa com circulação de ar a 105 °C, por 24 h. Em seguida, foram resfriadas, pesadas e trituradas em multiprocessador para determinação do teor de nitrogênio pelo método de Kjeldahl descrito pela AOAC (1984).

A digestibilidade verdadeira foi calculada, medindo-se a quantidade de nitrogênio ingerida na dieta, a quantidade excretada nas fezes e a perda metabólica no material fecal. Esta última foi estimada pelo montante de nitrogênio excretado pelos ratos alimentados com dieta livre desse elemento (AMAYA; ACEVEDO; BRESSANI, 1991).

O cálculo da digestibilidade verdadeira (DV) foi feito de acordo com a seguinte fórmula:

$\% \text{ Digestibilidade} = \frac{I - (F - FK) \times 100}{I}$ , sempre considerando o padrão de consumo alimentar habitual individual de cada animal (quanto cada rato consome de alimento) determinado durante o período de 3 dias de adaptação.

onde,

I = Nitrogênio ingerido pelo grupo teste.

F = Nitrogênio fecal do grupo teste.

FK = Nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica.

#### **4.2.14 Avaliação dos parâmetros bioquímicos em ratos *wistar* submetidos à dieta com inibidor de tripsina (Segundo experimento)**

Ao término dos testes com as dietas os 30 ratos (6 dieta S, 6 dieta NP, 6 dieta PA, 6 dieta AHTI, 6 dieta PG) foram colocados em jejum por 12 a 15 horas e, em seguida, anestesiados com xilazina 2% e quetamina 5% e eutanasiados. O sangue foi coletado por punção cardíaca e armazenado em tubos Falcon. Foram realizadas as mesmas determinações e as análises obedeceram aos mesmos protocolos descritos no item 4.2.3. Os resultados foram avaliados considerando como referência os valores do grupo controle, entretanto estes valores encontram-se dentro dos intervalos normais estabelecidos para ratos *wistar* em outros biotérios citados na literatura (DANTAS et al., 2006, GIKNIS; CLIFFORD, 2008, MELO et al., 2012).

#### **4.2.15 Avaliação do consumo alimentar em tempos específicos, dos parâmetros bioquímicos e de CCK em ratos *wistar* submetidos à dieta com inibidor de tripsina (Terceiro experimento)**

##### 4.2.15.1 Dietas

As dietas experimentais para os ratos seguiram as recomendações da AIN-93G de acordo com Reves et al., (1993), sendo utilizada a Dieta Padrão (ANI-93G); Dieta Caseína (dieta Padrão AIN-93G suplementada por gavagem com Caseína 25 mg/kg); Dieta IS (dieta Padrão AIN-93G suplementada por gavagem com Inibidor de Tripsina de Soja 25 mg/kg); Dieta AHTI 25 (dieta Padrão AIN-93G suplementada por gavagem com AHTI 25 mg/kg) e Dieta AHTI 50 (dieta Padrão AIN-93G suplementada por gavagem com AHTI 50 mg/kg). Todas as dietas AIN-93G foram oferecidas pela via oral, sendo administrada por gavagem o inibidor AHTI, a caseína, o inibidor de tripsina de soja e a água para o grupo P.

##### 4.2.15.2 Animais

Para avaliação do consumo alimentar em tempos específicos, dos parâmetros bioquímicos e de CCK foram criados 5 novos grupos de ratos *wistar* (n= 6). Após 3 dias de adaptação seguindo as recomendações de Komarnytsky; Cook; Raskin, (2011), com algumas modificações, os ratos foram distribuídos individual e casualmente em 5 lotes e tratados por 14 dias com as dietas descritas no item 4.2.12.1.

O consumo das dietas e de água e o ganho de peso dos animais foram monitorados diariamente.

##### 4.2.15.3 Consumo alimentar

Estabelecido o padrão de consumo habitual de cada animal (quanto cada rato consome) durante os 3 dias de adaptação, os animais foram submetidos aos testes com as dietas e avaliados quanto as alterações no consumo alimentar 1, 2 e 18 horas após a administração oral de uma dose única de 100 g das dietas: Dieta Padrão (P); Dieta Caseína 25 mg/kg; Dieta IS 25 mg/kg; Dieta AHTI 25 mg/kg e Dieta AHTI 50 mg/kg durante 14 dias. Antes da administração oral das dietas,

diariamente os animais ficavam de jejum durante um período de 6 horas. Os cálculos obedeceram ao mesmo protocolo descrito no item 4.2.2.1.1.

Os resultados foram expressos em percentual (%), sendo considerado 100% a média do padrão de consumo alimentar habitual dos ratos antes do tratamento (3 dias). Então, após os testes com as dietas foram obtidas as percentagens de diminuição do consumo em (%).

#### 4.2.15.4 Parâmetros bioquímicos

No ultimo dia do experimento, ao término da 1ª hora após administração dos testes com as dietas, os ratos foram anestesiados com xilazina 2% e quetamina 5% e eutanasiados. O sangue foi coletado por punção cardíaca e armazenado em tubos Falcon. Seguiram-se as determinações e as análises obedeceram-se aos mesmos protocolos descritos no item 4.2.3.

A concentração sérica de albumina foi determinada pelo sistema de medição que se baseia no desvio do pico de absorvidade máxima do corante verde de bromocresol, utilizando-se o kit comercial Labtest Diagnóstica S.A.®, a cor formada é proporcional à quantidade de albumina na amostra.

Após esse procedimento os tubos foram misturados e depois de 2 minutos a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 630 nm. Para se obter a concentração de albumina nas amostras, foi feito o seguinte cálculo:

$$\text{Albumina (g/dL)} = (\text{absorbância do teste/absorbância do padrão}) \times 3,8$$

#### 4.2.15.5 Dosagem de CCK

##### 4.2.15.5.a Coleta do Sangue

Também no ultimo dia do experimento, ao término da 1ª hora após administração das dietas, foi avaliado o nível plasmático de CCK, os 30 ratos (6 dieta P, 6 dieta C, 6 dieta IS 25 mg/kg, 6 dieta AHTI 25 mg/Kg, 6 dieta AHTI 50 mg/kg) foram anestesiados com xilazina 2% e quetamina 5% e eutanasiados. A coleta do sangue seguiu as especificações do Kit (Phoenix Pharmaceuticals Inc). Assim o sangue foi coletado em tubos a vácuo com EDTA, centrifugado (1,600 x g

por 15 minutos a 4°C) em tubos de centrifuga contendo (0,6 Aprotinina TIU/ml de sangue) e o plasma coletado e mantido a -70°C.

#### 4.2.15.5.b Extração do plasma

A extração do plasma seguiu as especificações do Kit (Phoenix Pharmaceuticals Inc). O plasma foi acidificado com tampão A na proporção de 1:1 e centrifugado por 6.000 x *g* por 20 minutos a 4 °C. A coluna SEP (contendo 200 mg de cadeia hidrocarbonada da resina hidrofóbica C18) foi lavada com tampão B (1 mL uma única vez) e, em seguida, com tampão A (3 mL por 3 vezes).

O plasma então foi adicionado à coluna SEP C18, o material não retido na coluna foi eluído com Tampão A (3 mL, 2 vezes) e a CCK, presente nos plasmas analisados, denominado amostra de CCK dos testes com as dietas, foi eluído com tampão B (3 mL, 1 vez) e armazenados em tubo de polietileno.

#### 4.2.15.5.c Imunoensaio

O Imunoensaio seguiu as especificações do Enzyme Immunoassay Kit (Phoenix Pharmaceuticals Inc). Todos os reagentes foram dissolvidos no tampão denominado “Tampão de ensaio 1 x” diluído 20 vezes fornecido pelo Kit.

Foram adicionados 50 µL do peptídeo padrão (CCK), das amostras de CCK dos testes com as dietas e do peptídeo controle (CCK-26-33, não sulfatado; ratos, camundongos e humanos) em cada poço e 25 µL do anticorpo primário, 25 µL do peptídeo biotilado, sendo incubados à temperatura ambiente (20-23 °C) por 2 horas.

Em seguida, os poços foram lavados 4 vezes com 350 µL com “Tampão de ensaio 1 x”. Foram adicionados 100 µL em cada poço de solução de SA-HRP (peroxidase de estreptavidina) e incubados à temperatura ambiente (20-23 °C) por 1 hora e foram lavados 4 vezes com 350 µL com “Tampão de ensaio 1 x”.

Por fim, foram adicionados 100 µL de substrato TMB (substrato de peroxidase) e incubados à temperatura ambiente (20-23 °C) por 1 hora. Finalizada a reação, foram adicionados 100 µL de HCL 2N. A absorbância foi medida a 450nm e

os resultados foram calculados também de acordo com as especificações do Enzyme Immunoassay Kit (Phoenix Pharmaceuticals Inc).

#### **4.2.16 Análises estatísticas**

Os dados foram analisados quanto à normalidade e homocedasticidade por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. Os dados que não se adequaram às premissas do teste foram transformados (log 10, ln, e raiz quadrada). O peso, eficiência alimentar, consumo alimentar, CCK e parâmetros bioquímicos (Glicose, Colesterol total, Colesterol HDL, Colesterol LDL, VLDL, Triglicerídeos, TGO, TGP, GGT, albumina, globulina e proteínas totais) foram analisados utilizando o teste *t-Student* ou a ANOVA *one-way* para constatação de possíveis diferenças entre os grupos ao longo do experimento. Quando diferenças significativas foram detectadas, o teste *post-hoc* de Tukey foi utilizado. Para o consumo alimentar em tempos específicos, evolução no ganho de peso e eficiência alimentar, os resultados foram analisados utilizando a ANOVA *two-way* para constatação de possíveis diferenças entre os grupos ao longo do experimento. Quando diferenças significativas foram detectadas, o teste *post-hoc* de Tukey também foi utilizado, sempre considerando  $p < 0,05$ . Todos os dados foram analisados utilizando o software Statistica 7 (Stat Soft, Tulsa, OK, EUA).

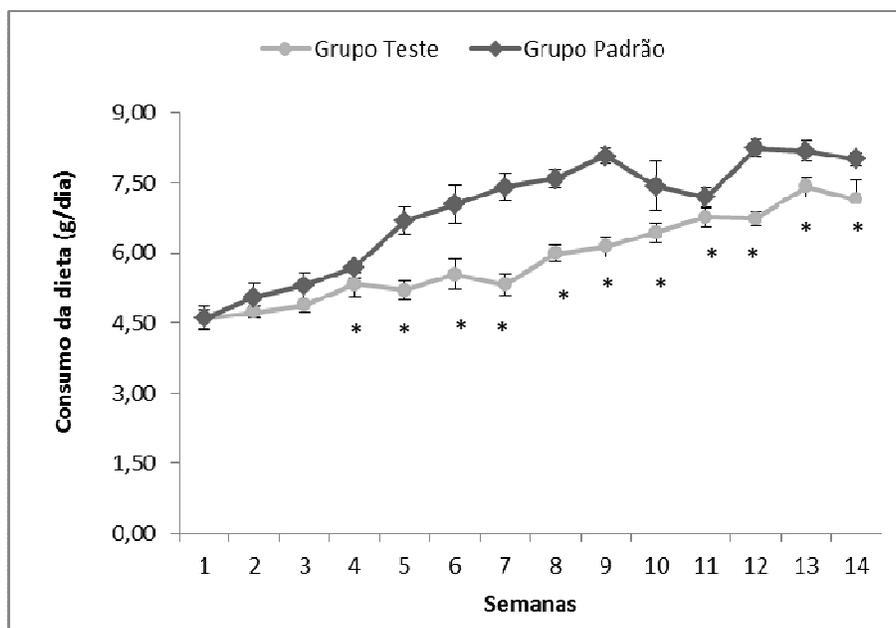
## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO E CONSUMO ALIMENTAR EM CAMUNDONGOS SWISS SUBMETIDOS À DIETA HIPERCALÓRICA RICA EM PAÇOCA DE AMENDOIM (PRIMEIRO EXPERIMENTO)

Na avaliação do ganho de peso e consumo alimentar em camundongos *swiss*, foi demonstrado que os animais do grupo com dieta hipercalórica (DH), GT, consumiram uma dieta com valor calórico 29% maior que o GP, grupo com dieta padrão (DP). Na análise dos macronutrientes, foi encontrado para DH um percentual maior de lipídios e carboidratos, 18% e 58% respectivamente, mostrando ser uma dieta hipercalórica por ser hiperlipídica e hiperglicídica, quando comparada à DP, oferecendo 4,5 Kcal/g (Tabela 02).

Conforme pode ser visto na Figura 09, ao final de quatorze semanas, houve um menor consumo alimentar médio do grupo de camundongos GT submetidos à DH, quando comparado com o GP com dieta padrão ( $f= 27,2$ ;  $p <0,05$ ), após a 5ª semana essa diferença se torna clara.

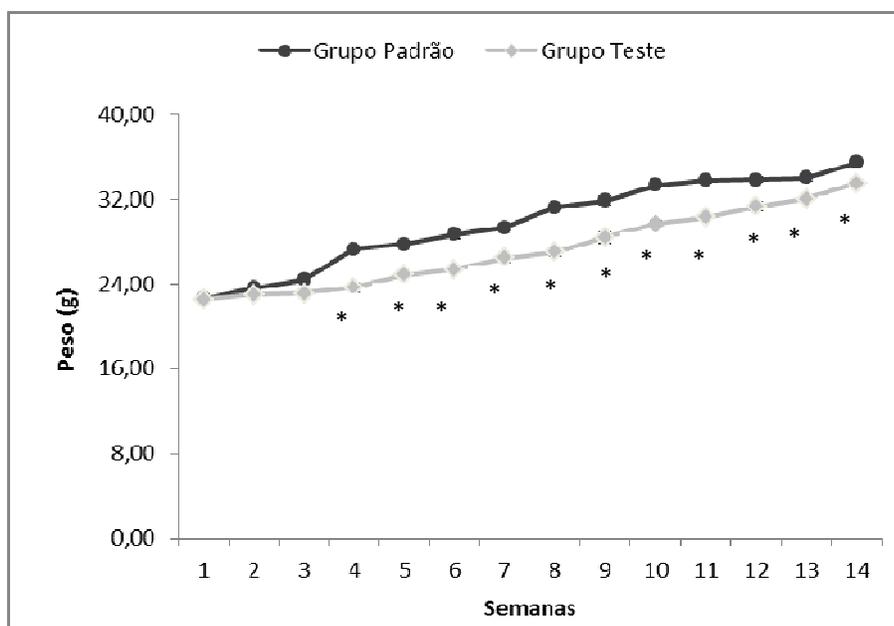
Figura 09 - Consumo alimentar médio em gramas por dia (g/dia) de camundongos swiss submetidos à Dieta Padrão (Grupo Padrão) e Dieta Hipercalórica (Grupo Teste) durante 14 semanas.



A dieta padrão utilizada foi a comercial Labina (Purina®, Paulínia, SP, Brasil). A dieta hipercalórica padronizada nesse experimento foi 30% de ração Labina para 70% de paçoca de amendoim. Dados expressos em média  $\pm$  desvio-padrão de 14 semanas de grupo de animais (Grupo Padrão; n= 08, Grupo Teste; n=08). \*  $p < 0,05$  vs Grupo Padrão. ANOVA *two-way* com teste *post-hoc* de Tukey.

Em relação ao ganho de peso corporal, nas três primeiras semanas de tratamento, o peso corporal médio dos camundongos pertencentes aos dois grupos estudados foi semelhante, no entanto após a terceira semana foi constatado que o peso corporal dos animais do GP com dieta DP foi estatisticamente significativamente ( $f = 46,0$ ;  $p < 0,05$ ) maior que os animais do GT com dieta DH (Figura 10). Sendo demonstrado que os animais do grupo GT ingeriram menor quantidade de ração comparado ao GP (Figura 09). É importante ressaltar que a quantidade em gramas de ração oferecidas aos camundongos era igual para os dois grupos.

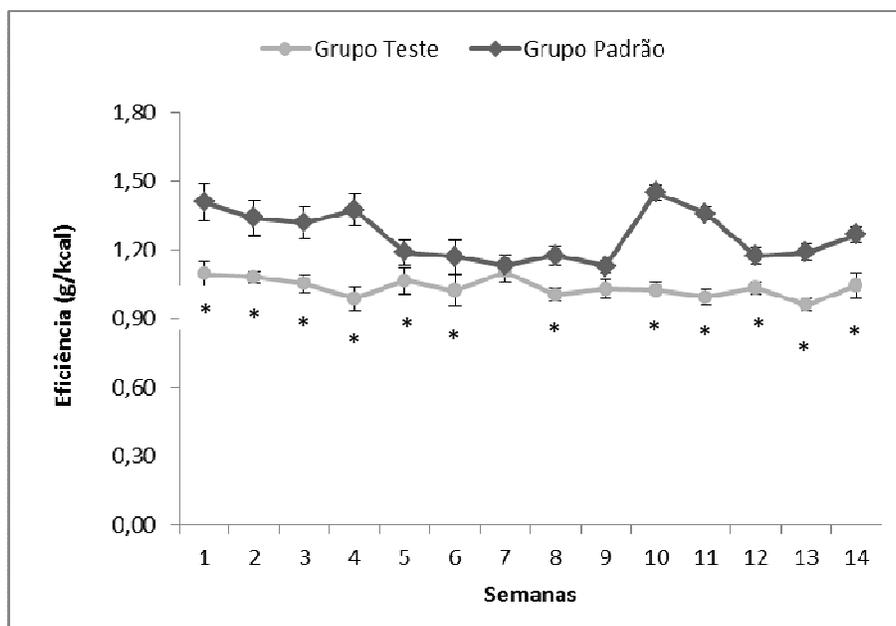
Figura 10 - Evolução do ganho de peso corporal médio em gramas (g) de camundongos *swiss* submetidos à Dieta Padrão (Grupo Padrão) e Dieta Hipercalórica (Grupo Teste) durante 14 semanas.



A dieta padrão utilizada foi a comercial Labina (Purina®, Paulínia, SP, Brasil). A dieta hipercalórica padronizada neste experimento foi 30% de ração Labina para 70% de paçoca de amendoim. Dados expressos em média  $\pm$  desvio-padrão de 14 semanas de grupo de animais (Grupo Padrão; n= 08, Grupo Teste; n=08). \*  $p < 0,05$  vs grupo padrão. ANOVA *two-way* com teste *post-hoc* de Tukey.

Quanto à eficiência alimentar (EA), ou seja, a conversão de calorias em peso corporal foi observada maior EA no grupo GP comparado ao grupo GT (Figura 11), mesmo o GT sendo o grupo submetido a uma dieta mais calórica que o GP ( $f=16.7$ ;  $p < 0.05$ ).

Figura 11 - Eficiência alimentar média em gramas por kilocalorias (g/Kcal) de camundongos *swiss* submetidos à Dieta Padrão (Grupo Padrão) e Dieta Hipercalórica (Grupo Teste) durante 14 semanas.



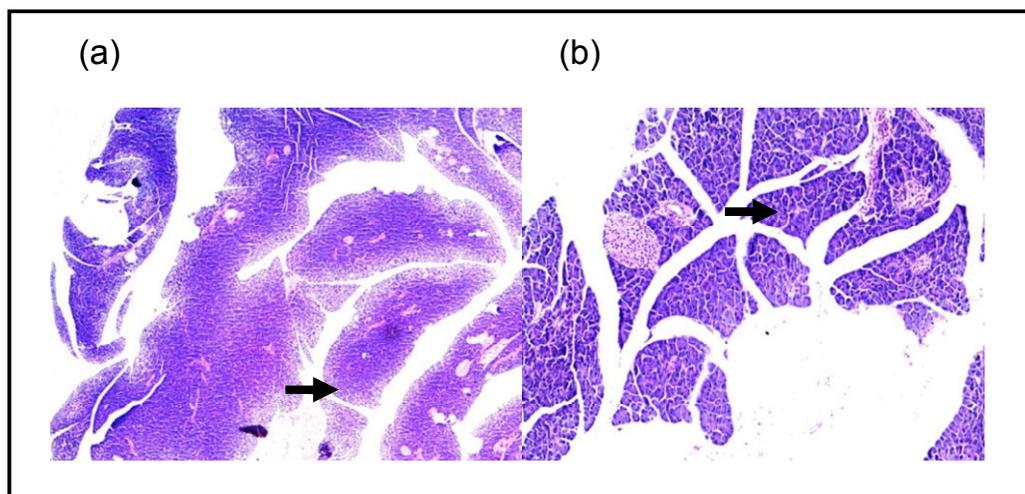
A dieta padrão utilizada foi a comercial Labina (Purina®, Paulínia, SP, Brasil). A dieta hipercalórica padronizada, nesse experimento, foi 30% de ração Labina para 70% de paçoca de amendoim. Dados expressos em média  $\pm$  desvio-padrão de 14 semanas de grupo de animais (Grupo Padrão; n= 08, Grupo Teste; n=08). \*  $p < 0,05$  vs grupo padrão. ANOVA *two-way* com teste *post-hoc* de Tukey.

## 5.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MORFOFISIOLÓGICOS EM ÓRGÃOS DE CAMUNDONGOS *SWISS* SUBMETIDOS À DIETA HIPERCALÓRICA RICA EM PAÇOCA DE AMENDOIM (PRIMEIRO EXPERIMENTO)

Foi realizada a análise histopatológica do pâncreas dos camundongos e demonstrado que os animais no GP não apresentaram alteração patológica. Já no grupo teste (GT), dos 8 animais, apenas 3 (37.5%) apresentaram hiperplasia das glândulas acinares (Figura 12), sem alterações nas ilhotas de Langherans.

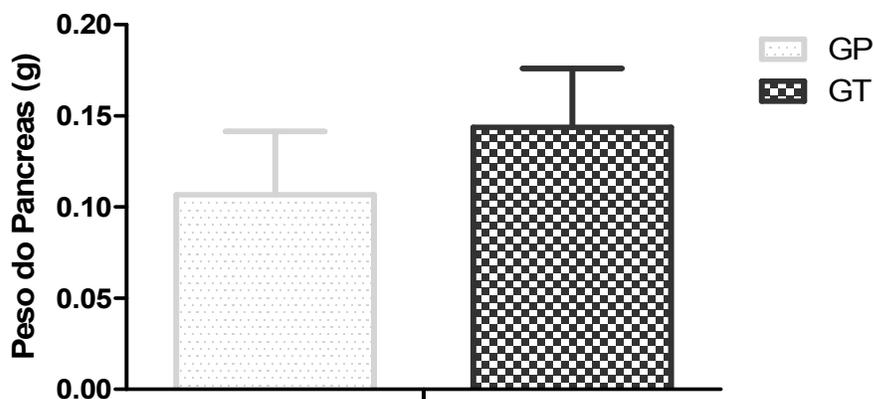
A Figura 12 observa-se que não houve aumento significativo do peso do pâncreas do grupo (GT) quando comparado ao grupo (GP).

Figura 12 - Histologia do pâncreas de camundongos *swiss* submetidos à Dieta Padrão (Grupo Padrão) e Dieta Hipercalórica (Grupo Teste) durante 14 semanas.



(a) Grupo Teste; n= 08 e (b) Grupo Padrão; n= 08. No último dia do experimento, o pâncreas foi extraído logo, o tecido foi corado com hematoxilina e eosina. Os grupos foram examinados e os resultados representativos são mostrados (ampliação original, x 312). A dieta padrão utilizada foi a comercial Labina (Purina®, Paulínia, SP, Brasil). A dieta hipercalórica padronizada neste experimento foi 30% de ração Labina para 70% de paçoca de amendoim.

Figura 13 - Morfometria do pâncreas de camundongos *swiss* submetidos à Dieta Padrão (Grupo Padrão; GP) e Dieta Hipercalórica (Grupo Teste; GT) durante 14 semanas.



No último dia do experimento, após a retirada do pâncreas, os órgãos foram lavados em solução salina, secos em papel absorvente adequado e pesados, o resultado é expresso pela média dos pesos dos pâncreas obtidos por grupo (n=08). A dieta padrão utilizada foi a comercial Labina (Purina®, Paulínia, SP, Brasil). A dieta hipercalórica padronizada, nesse experimento, foi 30% de ração Labina para 70% de paçoca de amendoim. Dados expressos em média  $\pm$  desvio-padrão\* indicam diferença significativa com  $p < 0.05$ , teste *t student*.

### 5.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS SWISS SUBMETIDOS À DIETA HIPERCALÓRICA RICA EM PAÇOCA DE AMENDOIM (PRIMEIRO EXPERIMENTO)

Na Tabela 04, constam os resultados da análise bioquímica sérica, onde apenas os triglicerídeos e a HDLc mostraram diferença significativa entre os grupos.

Tabela 04 - Parâmetros bioquímicos plasmáticos de camundongos swiss submetidos à Dieta Padrão e Dieta Hipercalórica durante 14 semanas.

	Grupo Padrão (GP)		Grupo Teste (GT)		<i>t</i>	<i>P</i>
	Média	SEM	Média	SEM		
Glicose Sanguínea de jejum (mg/dl)	123,70	9,20	134,00	11,25	0,833	0,4260
Colesterol Total (mg/dl)	50,67	2,56	48,17	3,8	0,623	0,5460
HDLc ( <i>high-density lipoprotein</i> colesterol) (mg/dl)	56,17	5,31	73,33	4,26	2,518	*0,0305
LDLc ( <i>low-density lipoprotein</i> colesterol) (mg/dl)	37,80	6,98	36,20	1,20	0,255	0,8270
Triglicerídeos (mg/dl)	55,83	4,57	76,83	1,05	0,792	*0,0056
TGO (transaminase glutâmico oxalacética)(U/L)	76,50	4,23	82,00	3,51	1,000	0,3400
TGP (transaminase glutâmico pirúvica) (U/L)	30,17	1,35	32,83	2,67	0,889	0,3944

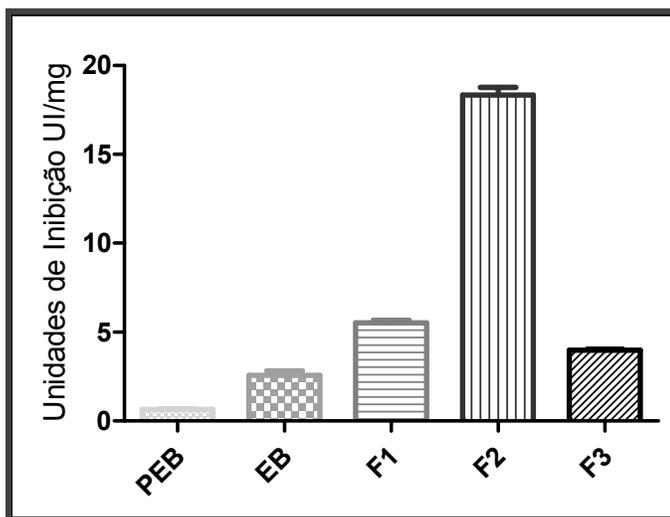
A dosagem dos parâmetros bioquímicos foi realizada, apenas, no último dia do experimento. Dados expressos em média  $\pm$  desvio-padrão de grupo de animais; *t*=cálculo do teste; \* indicam diferença significativa entre os grupos (*n*=08); *p*<0.05, teste *t student*. A dieta padrão utilizada foi a comercial Labina (Purina®, Paulínia, SP, Brasil). A dieta hipercalórica padronizada nesse experimento foi 30% de ração Labina para 70% de paçoca de amendoim.

### 5.4 ISOLAMENTOS DO INIBIDOR DE TRIPSINA DA PAÇOCA DE AMENDOIM

#### 5.4.1 Atividades antitriptica do extrato e frações proteicas e determinações de proteínas solúveis

O extrato de proteínas totais da paçoca foi fracionado em três faixas de concentração de sulfato de amônio (F1, F2 e F3) e a atividade inibitória de tripsina bovina foi avaliada em cada uma delas. O extrato bruto inibiu a atividade trípica em 2,58 UI/mg e, dentre as frações precipitadas com sulfato de amônio, a F2 (30-60%) apresentou maior atividade antitriptica, atingindo 18,3 UI/mg de inibição (Figura 14).

Figura 14 - Inibição da atividade de tripsina pelo precipitado do extrato bruto (PEB), extrato bruto (EB) e frações proteicas saturadas com sulfato de amônio nas faixas de 0-30% (F1), 30-60% (F2) e 60-90% (F3) obtidos da farinha de paçoca de amendoim.

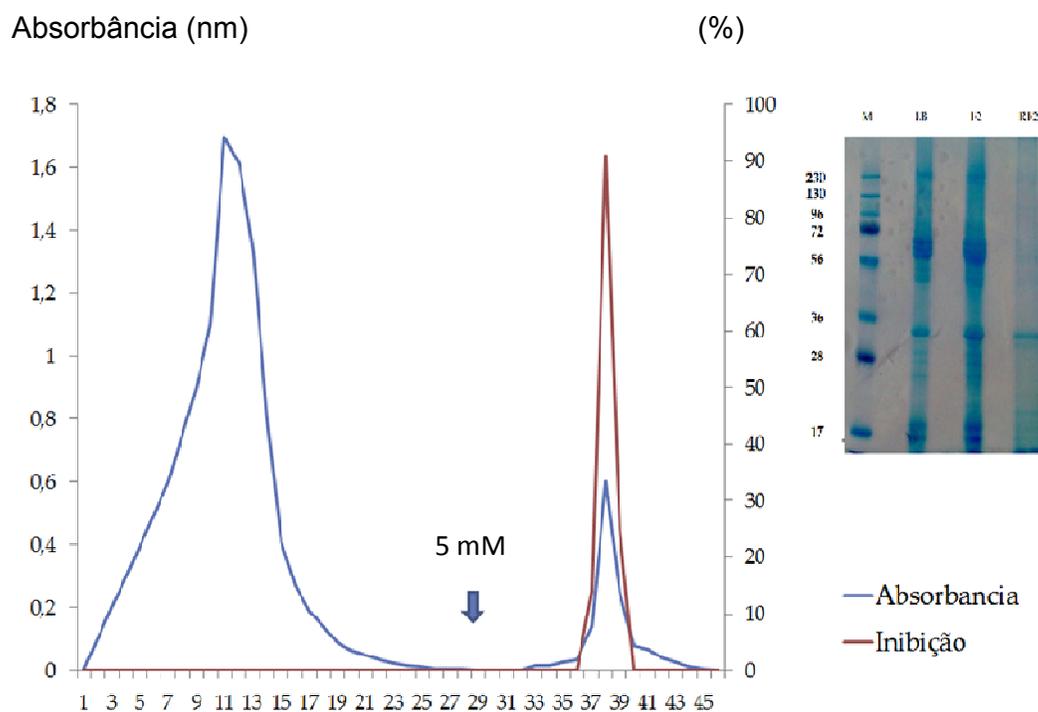


Os resultados foram expressos em UI (Unidade de Inibição)/mg de peso seco da amostra, utilizando-se 100  $\mu$ L do PEB, EB F1, F2 e F3 e BApNA como substrato.

#### 5.4.2 Avaliação do grau de pureza e determinação da massa molecular dos inibidores proteicos por eletroforese em gel de poliacrilamida descontínuo e desnaturante (SDS-PAGE)

As etapas de purificação (EB, F2 e retido da cromatografia de afinidade) parcial do inibidor de paçoca de amendoim foram analisadas por eletroforese em condições desnaturantes SDS-PAGE 15% corado com *Coomassie blue* R 250 (Figura 15). Uma única banda majoritária foi visualizada, revelando que o inibidor, nomeado de AHTI, foi parcialmente purificado. O AHTI apresentou rendimento de 63,4 e foi purificado 267 vezes (Tabela 05).

Figura 15 - Cromatografia de afinidade em Tripsina-Sepharose CL 4B da F2 de paçoca de amendoim e SDS-PAGE do AHTI.



Perfil proteico a 280 nm (----) e de atividade antitriptica (----) das proteínas retidas e eluídas com solução de HCl 1 mM. Fluxo constante de 3,5 mL/min. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Descontínuo e Desnaturante (SDS-PAGE) corado com *Coomassie blue* R250. M - Marcador molecular EB- Extrato bruto obtido da paçoca de amendoim. F2- Fração proteica saturada com sulfato de amônio na faixa de 30-60% obtido da paçoca de amendoim. RF2 = AHTI - Material retido da fração F2 na coluna de afinidade em tripsina.

Tabela 05: Etapas da purificação parcial do AHTI.

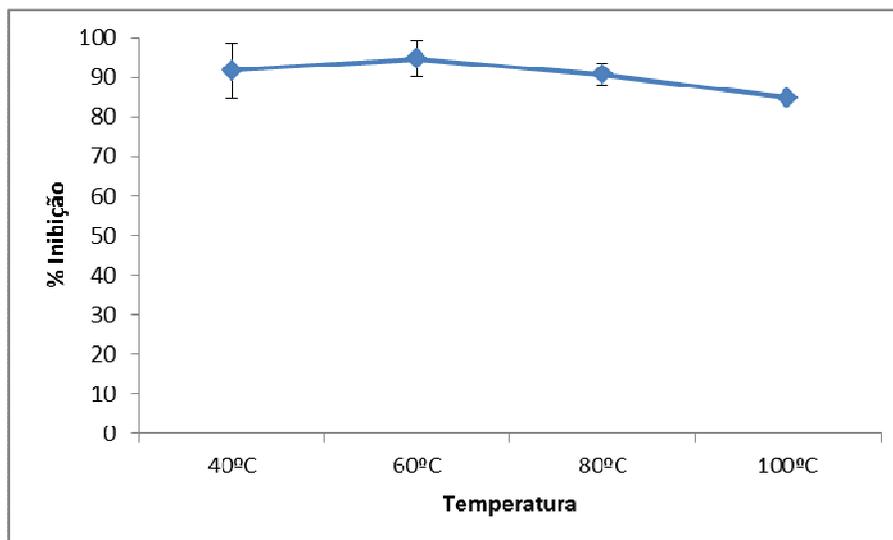
<b>Etapas</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>Proteína total (mg)</b>	<b>Atividade inibitória total (UI)</b>	<b>Atividade específica (UI/mg)</b>	<b>Purificação (X)</b>	<b>Recuperação (%UI)</b>
<b>Extrato Bruto</b>	150	432.00	17.9	0.04	1	100
<b>F2</b>	25	160.00	18.8	0.12	2.75	95.2
<b>AHTI</b>	12	2.64	28.2	10.68	267	63.4

Atividade específica é obtida pela relação da atividade inibitória total pela proteína total; o índice de purificação é a relação da atividade específica de cada fração pela atividade específica do extrato bruto; o rendimento é a relação entre a atividade inibitória total de cada fração pela atividade inibitória total do extrato bruto. Uma unidade de inibidor (UI) foi definida como a quantidade de inibidor que diminui a atividade da enzima em 0,01 da absorbância a 410 nm. F2- Fração proteica saturada com sulfato de amônio na faixa de 30-60% obtido da paçoca de amendoim. AHTI - Material retido da fração F2 na coluna de afinidade em tripsina.

#### **5.4.3 Estabilidade do AHTI em variações de temperaturas e pH**

O AHTI manteve sua capacidade inibitória sobre a atividade catalítica de tripsina na faixa de temperatura de 40 a 100 °C. Na Figura 16 pode ser observada que o AHTI de 60 °C a 80 °C manteve sua atividade máxima de inibição da atividade catalítica da tripsina (92%). Entretanto, acima de 80 °C houve um decréscimo da atividade inibitória em torno de 8% (84%).

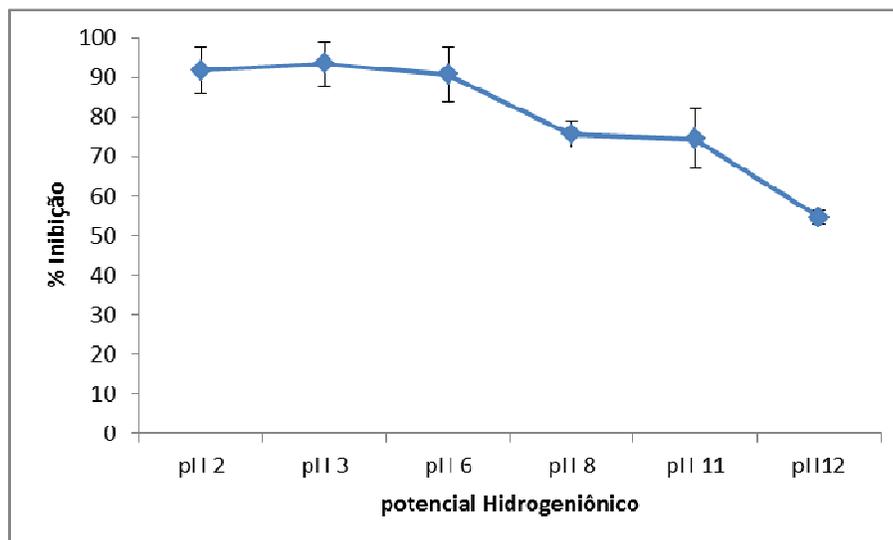
Figura 16 - Estabilidade do inibidor parcialmente purificado de paçoca de amendoim (AHTI) em diferentes temperaturas.



10  $\mu$ g (0.30) nM do inibidor foi pré-incubado por 30 min, a 37 °C em diferentes temperaturas (40 °C; 60 °C; 80 °C; 100 °C). A atividade inibitória sobre a tripsina foi determinada usando BApNA como substrato.

A estabilidade do AHTI em diversos valores de pH foi testada. Após ensaio antitriptico, verificou-se que a atividade de AHTI diminuiu em valores de pH acima 6,0, como pode ser visto na Figura 17.

Figura 17 - Estabilidade do inibidor parcialmente purificado de paçoca de amendoim (AHTI) à variação do pH.

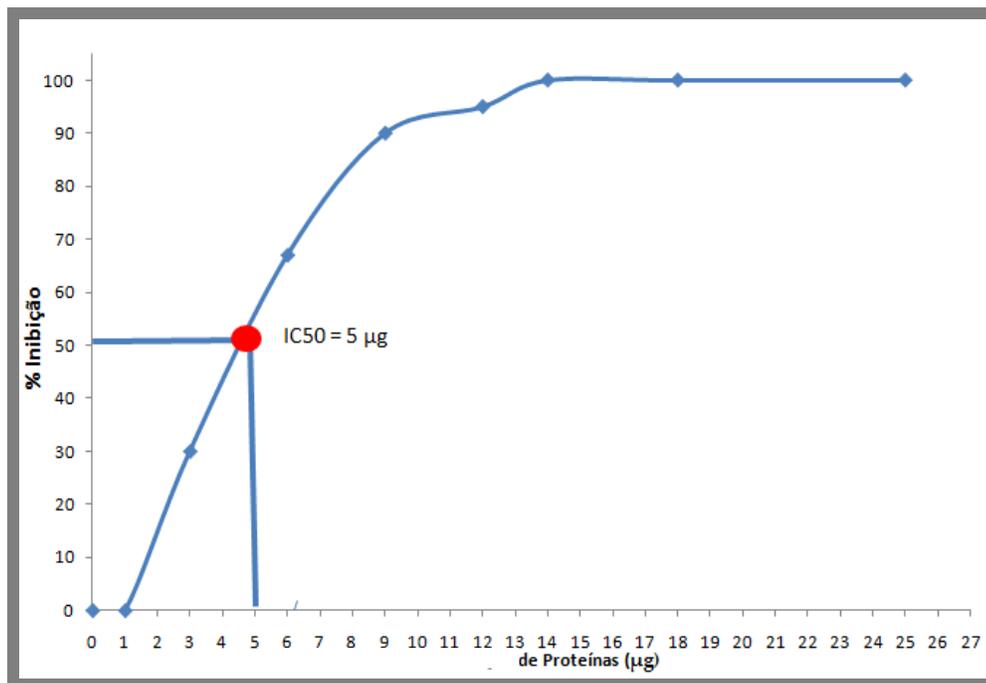


10  $\mu$ g (0.30 nM) do inibidor foi pré-incubado por 30 min, a 37  $^{\circ}$ C em diferentes pHs (2; 3; 6; 8; 11; 12). A atividade inibitória sobre a tripsina foi determinada usando BApNA como substrato.

#### 5.4.4 Propriedades inibitórias e determinação da constante de inibição

Para determinar a concentração de AHTI que inibe 50% da atividade da tripsina ( $IC_{50}$ ) foi construída uma curva de titulação e, assim, determinado o percentual de inibição da atividade da enzima para cada concentração de inibidor utilizada (Figura 18). De acordo com a titulação, a  $IC_{50}$  do AHTI é cerca de 5  $\mu$ g (0.15 nM). Outro ponto importante, determinado com base nos dados da curva de titulação, foi o percentual máximo de inibição da tripsina atingido pelo AHTI, sendo em torno de 93%.

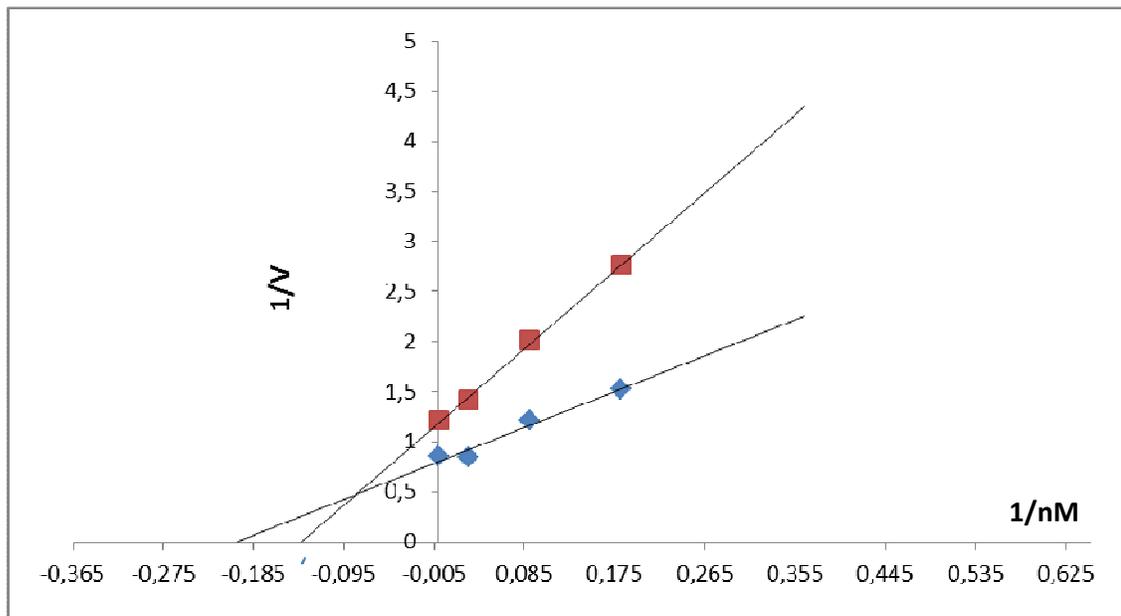
Figura 18 - Determinação do IC<sub>50</sub> do inibidor de tripsina purificado de paçoca de amendoim (AHTI).



Curva de titulação utilizando concentrações crescentes de AHTI: 0; 1,84; 3,68; 7,35; 11; 14,71; 29,41 e 58,82 nM e concentração fixa de tripsina (12,88 µM). A concentração de AHTI que inibe 50% da atividade da tripsina (IC<sub>50</sub>) foi determinada usando BApNA como substrato.

Dessa maneira, foi construído o gráfico para determinação da K<sub>i</sub> de AHTI de acordo com Dixon et al. (1979) (Figura 19). Esse gráfico levou em consideração os valores de interseção com o eixo 1/v e de inclinação das retas de tendência do gráfico de duplo-recíproco e as concentrações de inibidor usadas no ensaio. Com base nesses dados, foi calculado um K<sub>i</sub> de 0,085 nM.

Figura 19 - Determinação do valor de  $K_i$  do inibidor de tripsina purificado de paçoca de amendoim (AHTI).



A constante de inibição ( $K_i$ ) de AHTI sobre a tripsina foi determinada pelo método de Dixon et al., (1979). O valor de  $K_i$  foi obtido dos interceptos das retas das duas concentrações do substrato BA pNA utilizadas. O valor da velocidade foi determinado por  $V=DO405nm/h/mL$ .

## 5.5 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO E DO CONSUMO ALIMENTAR EM RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS À DIETA COM INIBIDOR DE TRIPSINA (SEGUNDO EXPERIMENTO)

### 5.5.1 Avaliação da digestibilidade proteica em ratos *wistar*

O experimento da digestibilidade proteica de ratos *wistar*, alimentados com ração AIN-G93 e suplementados com 50 mg/kg de AHTI por gavagem foi realizado para avaliar a influência do AHTI na digestão das proteínas da ração. O experimento de digestibilidade proteica com a suplementação com AHTI revelou que a dieta possui digestibilidade semelhante à da dieta padrão (AIN-96G) (Tabela 06).

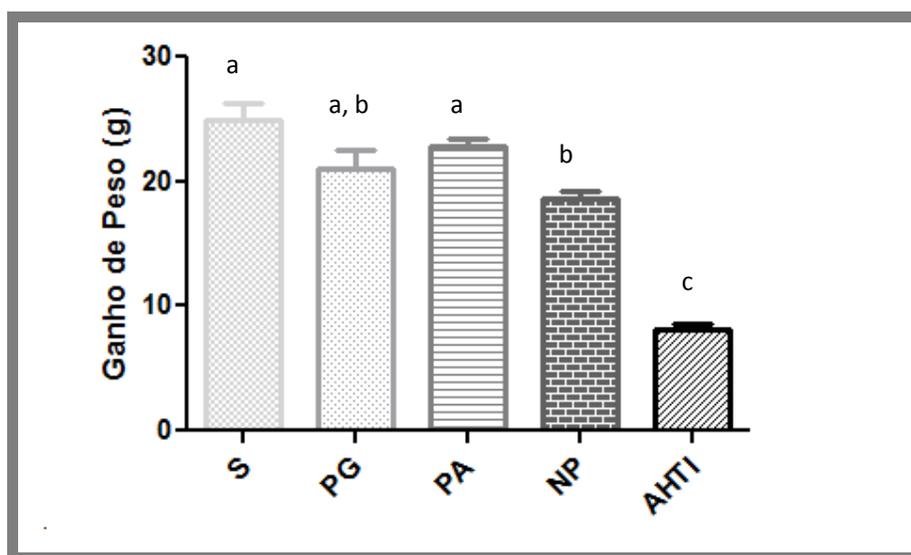
Tabela 06 - Parâmetros da Digestibilidade Verdadeira (Dv) e Aparente (Da) em ratos *wistar* submetidos à dieta padrão, apteica, com paçoca de amendoim e com inibidor de tripsina de paçoca de amendoim (AHTI) durante 11 dias.

	Dieta Padrão	Dieta Padrão controle (Padrão + gavagem com água)	Dieta teste 1 (Padrão + 70% amendoim)	Dieta teste 2 (Padrão + gavagem com AHTI)	ANOVA
Da (%)	96.36	96.68	96.32	94.40	$f = 2.227$ $p = 0.137$
Dv (%)	93.70	93.10	90.70	90.68	$f = 3.857$ $p = 0.067$
VBa (%)	93.50	93.40	92.30	91.60	$f = 3.247$ $p = 0.060$

Dados expressos em porcentagem (%) em média de 11 dias de grupo de seis animais.\* Indicam diferença significativa entre os grupos (n=6);  $p < 0.05$ , ANOVA *one-way* com teste *post-hoc* de Tukey;  $f$  = cálculo do teste. VBa- Valor Biológico Aparente. Dietas: dieta Padrão (AIN-93G), dieta apteica (AIN-93G sem proteína), Dieta Padrão controle (AIN-93G suplementada por gavagem com água) dieta teste 1 (70% de paçoca de amendoim e 30% de AIN-93G) e dieta teste 2 (AIN-93G suplementada por gavagem com 50 mg/kg de AHTI).

Durante os 11 dias, também foi verificado que o ganho de peso do grupo padrão foi superior quando comparado aos ratos suplementados com AHTI (Figura 20). Além disso, o consumo de ração foi menor nos grupos tratados com AHTI (Tabela 07).

Figura 20 - Ganho de peso médio em gramas por dia (g/dia) de ratos *wistar* submetidos à dieta Padrão, apteica, com paçoca de amendoim e com inibidor de tripsina de paçoca de amendoim (AHTI) durante 11 dias.



Dietas: Dieta Padrão AIN-93G (S), Dieta Padrão AIN-93G com água por gavagem (PG), Dieta padrão 30% AIN-93G + 70% de amendoim (PA), Dieta apteica (NP) e Dieta Padrão AIN-93G com inibidor de tripsina de paçoca de amendoim por gavagem (AHTI). Dados expressos em média  $\pm$  desvio-padrão de 11 dias de grupo de seis animais. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos com  $p < 0.05$ , ANOVA *one-way* com teste *post-hoc* de Tukey

Os valores para os exames bioquímicos (Tabela 08) mostraram poucas diferenças entre os grupos. Para a glicose, os triglicerídeos e TGP, o grupo NP teve uma redução quando comparado com os outros grupos, já para a TGO teve aumento quando comparado aos demais.

Tabela 07: Consumo alimentar médio em gramas (g/dia), no 1º dia, 5º dia e 11º dia de ratos *wistar* submetidos a dieta Padrão, aprroteica, com paçoca de amendoim e com inibidor de tripsina de paçoca de amendoim (AHTI) durante 11 dias.

	<b>S</b> <b>(Padrão)</b>	<b>PG</b> <b>(Padrão</b> <b>com água</b> <b>por</b> <b>gavagem)</b>	<b>NP</b> <b>(aproteico)</b>	<b>PA</b> <b>(70%</b> <b>paçoca de</b> <b>amendoim)</b>	<b>AHTI</b> <b>(padrão</b> <b>com AHTI</b> <b>por</b> <b>gavagem)</b>	<b>ANOVA</b>
1º dia	9,88 ± 1,25 <sup>a</sup>	7,58 ± 1,98 <sup>a</sup>	8,53 ± 1,95 <sup>a</sup> <sub>c</sub>	9,44 ± 1,85 <sup>a</sup>	8,69 ± 1,25 <sup>a</sup>	<i>f</i> = 0,870 <i>p</i> = 0,514
5º dia	14,59 ± 2,09 <sup>A</sup>	13,56 ± 1,54 <sup>A</sup>	9,58 ± 3,06 <sup>A</sup>	11,35 ± 2,12 <sup>A</sup>	5,13 ± 0,58 <sup>B</sup>	<i>f</i> = 10,99 <i>p</i> = 0,001
11º dia	13,99 ± 2,54 <sup>a</sup>	12,58 ± 2,57 <sup>a, c</sup>	7,45 ± 2,06 <sup>b</sup>	8,79 ± 2,12 <sup>b</sup> <sub>c</sub>	6,15 ± 0,98 <sup>c</sup>	<i>f</i> = 8,188 <i>p</i> = 0,003

Dietas: Dieta Padrão AIN-93G (S), Dieta Padrão AIN-93G com água por gavagem (PG), Dieta padrão 30% AIN-93G + 70% de amendoim (PA), Dieta aprroteica (NP) e Dieta Padrão AIN-93G com inibidor de tripsina de paçoca de amendoim por gavagem (AHTI). Dados expressos em média ± desvio-padrão de 11 dias de grupo de seis animais. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos com  $p < 0,05$ , ANOVA *two-way* com teste *post-hoc* de Tukey. *f* = cálculo do teste.

Tabela 08- Parâmetros bioquímicos plasmáticos de ratos *wistar* submetidos à dieta Padrão, aprotéica, com paçoca de amendoim e com inibidor de tripsina de paçoca de amendoim (AHTI) durante 11 dias.

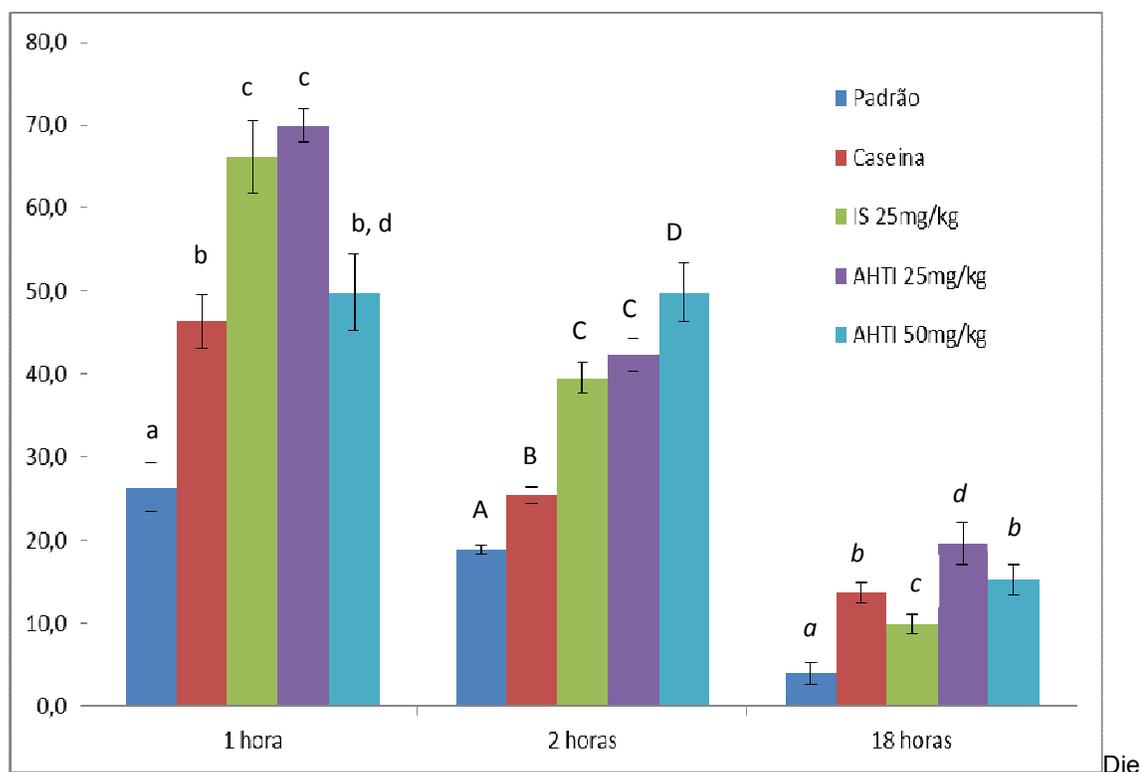
	<b>P</b> <b>(Padrão)</b>	<b>PG</b> <b>(Padrão com</b> <b>agua por</b> <b>gavagem)</b>	<b>NP</b> <b>(aproteico)</b>	<b>PA</b> <b>(70% paçoca</b> <b>de</b> <b>amendoim)</b>	<b>AHTI</b> <b>(padrão com</b> <b>AHTI por</b> <b>gavagem)</b>	<b>ANOVA</b>
Glicose Sanguínea de jejum (mg/dl)	151,20 ± 5,44 <sup>a</sup>	162,3 ± 9,098 <sup>a</sup>	93,00 ± 12,29 <sup>b</sup>	153,32 ± 6,25 <sup>a</sup>	126,00 ± 56,34 <sup>a</sup>	<i>f</i> = 16.57 <i>p</i> = 0.006
Colesterol Total (mg/dl)	51,4 ± 4,13 <sup>a</sup>	59,70 ± 5,92 <sup>a</sup>	41 ± 3,59 <sup>b</sup>	47,83 ± 2,58 <sup>a</sup>	56 ± 25,04 <sup>a</sup>	<i>f</i> = 1.371 <i>p</i> = 0.314
HDLc ( <i>high-density lipoprotein</i> colesterol) (mg/dl)	24,20 ± 1,15 <sup>a</sup>	23,83 ± 2,023 <sup>a</sup>	20,00 ± 0,73 <sup>b</sup>	20,85 ± 1,27 <sup>a</sup>	25,75 ± 11,51 <sup>a</sup>	<i>f</i> = 0.951 <i>p</i> = 0.475
LDLc ( <i>low-density lipoprotein</i> colesterol) (mg/dl)	19,20 ± 3,38 <sup>a</sup>	22,67 ± 4,120 <sup>a</sup>	18,00 ± 2,70 <sup>a</sup>	22,33 ± 1,52 <sup>a</sup>	19,00 ± 8,49 <sup>a</sup>	<i>f</i> = 4.886 <i>p</i> = 0.019
Triglicerídeos (mg/dl)	16,6 ± 2,37 <sup>a</sup>	18,50 ± 1,95 <sup>a</sup>	19,5 ± 2,01 <sup>a</sup>	23,16 ± 3,90 <sup>b</sup>	18,23 ± 5,47 <sup>a</sup>	<i>f</i> = 2.837 <i>p</i> = 0.082
TGO (transaminase glutâmico oxalacética)(U/L)	82,00 ± 8,08 <sup>a</sup>	91,00 ± 1,93 <sup>a</sup>	102,00 ± 10,21 <sup>b</sup>	83,66 ± 3,85 <sup>a</sup>	85,59 ± 10,97 <sup>a</sup>	<i>f</i> = 10.49 <i>p</i> = 0.075
TGP (transaminase glutâmico pirúvica)(U/L)	24,40 ± 4,76 <sup>a</sup>	26,83 ± 1,93 <sup>a</sup>	13,75 ± 1,11 <sup>b</sup>	28,83 ± 3,65 <sup>a</sup>	22,74 ± 4,60 <sup>a</sup>	<i>f</i> = 23.78 <i>p</i> = 0.061

A dosagem dos parâmetros bioquímicos foi realizada, apenas, no último dia do experimento (14º dia). Dietas: Dieta Padrão AIN-93G (P), Dieta Padrão AIN-93G com água por gavagem (PG), Dieta Padrão 30% AIN-93G + 70% de amendoim (PA), Dieta aprotéica (NP) e Dieta Padrão AIN-93G com inibidor de tripsina de paçoca de amendoim por gavagem (AHTI). Dados expressos em média ± desvio-padrão de grupo de seis animais. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos com  $p < 0.05$ , ANOVA *one-way* com teste *post-hoc* de Tukey. *f* = cálculo do teste

## 5.6 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR EM TEMPOS ESPECÍFICOS, DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DE CCK EM RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS À DIETA COM INIBIDOR DE TRIPSINA (TERCEIRO EXPERIMENTO)

Ao analisar o consumo alimentar na 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> horas após a administração de AHTI foi possível observar maior redução do consumo alimentar nos grupos suplementados com AHTI como mostrado na Figura 21.

Figura 21 - Redução do consumo alimentar 1, 2 e 18 horas após a administração por gavagem de uma dose única de concentrações diferentes de inibidores de tripsina durante 14 dias.



tas (100 g): Dieta Padrão (ANI-93G); Dieta Caseína (dieta Padrão AIN-93G suplementada por gavagem com Caseína 25 mg/kg); Dieta IS (dieta Padrão AIN-93G suplementada por gavagem com Inibidor de Tripsina de Soja 25 mg/kg); Dieta AHTI 25 (dieta Padrão AIN-93G suplementada por gavagem com AHTI 25 mg/kg) e Dieta AHTI 50 (dieta Padrão AIN-93G suplementada por gavagem com AHTI 50 mg/kg). Dados expressos em percentual (%) em média  $\pm$  desvio-padrão de 14 dias de grupo de seis animais. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos com  $p < 0.05$ , ANOVA *two-way* com teste *post-hoc* de Tukey.  $f =$  cálculo do teste.

A Tabela 09, mostra os resultados dos parâmetros bioquímicos avaliados no término do experimento, no 14º dia, uma hora após a administração oral de uma dose única de 100 g das dietas e não houve diferenças importantes nos parâmetros avaliados ao comparar os grupos tratados e controle.

Tabela 09- Parâmetros bioquímicos plasmáticos de ratos *wistar* uma hora após a administração por gavagem de uma dose única de diferentes concentrações de inibidores de tripsina durante 14 dias.

	<b>P</b>	<b>C</b> <b>25 (mg/Kg)</b>	<b>IS</b> <b>(25 mg/kg)</b>	<b>AHTI</b> <b>(25 mg/Kg)</b>	<b>AHTI</b> <b>(50 mg/Kg)</b>	<b>ANOVA</b>
Glicose Sanguínea de jejum (mg/dl)	219,00 ± 18,50 <sup>a</sup>	212,20 ± 62,20 <sup>a</sup>	180,00 ± 25,80 <sup>a</sup>	156,00 ± 16,10 <sup>a</sup>	180,00 ± 28,40 <sup>a</sup>	<i>f</i> =2.141 <i>p</i> =0.111
Colesterol Total (mg/dl)	68,60 ± 10,50 <sup>a</sup>	81,80 ± 7,79 <sup>a</sup>	88,90 ± 10,60 <sup>a</sup>	80,00 <sup>a</sup> ± 10,60 <sup>a</sup>	83,20 ± 6,90 <sup>a</sup>	<i>f</i> =3.442 <i>p</i> =0.027
HDLc ( <i>high-density lipoprotein</i> colesterol) (mg/dl)	24,20 ± 3,80 <sup>a</sup>	32,90 ± 7,67 <sup>a,b</sup>	35,00 ± 7,64 <sup>a,b</sup>	34,70 ± 5,70 <sup>b</sup>	33,40 <sup>a</sup> ± 3,70 <sup>b</sup>	<i>f</i> =3.168 <i>p</i> =0.033
LDLc ( <i>low-density lipoprotein</i> colesterol) (mg/dl)	26,20 ± 8,20 <sup>a</sup>	33,40 ± 6,10 <sup>a</sup>	39,00 ± 12,60 <sup>a</sup>	33,40 ± 22,20 <sup>a</sup>	36,50 ± 8,00 <sup>a</sup>	<i>f</i> =1.132 <i>p</i> =0.368
VLDLc	16,40 ± 3,79 <sup>a</sup>	20,25 ± 6,63 <sup>a</sup>	14,97 ± 6,78 <sup>a</sup>	12,10 ± 8,73 <sup>a</sup>	13,27 ± 6,09 <sup>a</sup>	<i>f</i> =1.267 <i>p</i> =0.314
Triglicerídeos (mg/dl)	82,20 ± 18,74 <sup>a</sup>	102,50 ± 33,13 <sup>a</sup>	75,00 ± 33,89 <sup>a</sup>	61,33 ± 44,60 <sup>a</sup>	65,67 ± 32,49 <sup>a</sup>	<i>f</i> =1.310 <i>p</i> =0.298
TGO ( <i>transaminase glutâmico oxalacética</i> )(U/L)	147,25 ± 3,75 <sup>a</sup>	158,80 ± 49,26 <sup>a</sup>	151,34 ± 6,23 <sup>a</sup>	147,70 ± 15,90 <sup>a</sup>	153,70 ± 9,36 <sup>a</sup>	<i>f</i> =1.329 <i>p</i> =0.293
TGP ( <i>transaminase glutâmico pirúvica</i> ) (U/L)	66,39 ± 2,35 <sup>a</sup>	60,00 ± 8,05 <sup>a,b</sup>	67,50 ± 4,13 <sup>a,b</sup>	61,04 ± 2,14 <sup>b</sup>	59,70 ± 2,84 <sup>b</sup>	<i>f</i> =3.242 <i>p</i> =0.063
GGT ( <i>gama glutarilaminotransferase</i> ) (U/L)	5,52 ± 0,68 <sup>a</sup>	7,06 ± 0,83 <sup>a,c</sup>	10,63 ± 1,24 <sup>b</sup>	9,73 ± 0,22 <sup>b</sup>	7,83 ± 1,18 <sup>c</sup>	<i>f</i> =3.858 <i>p</i> =0.017

---

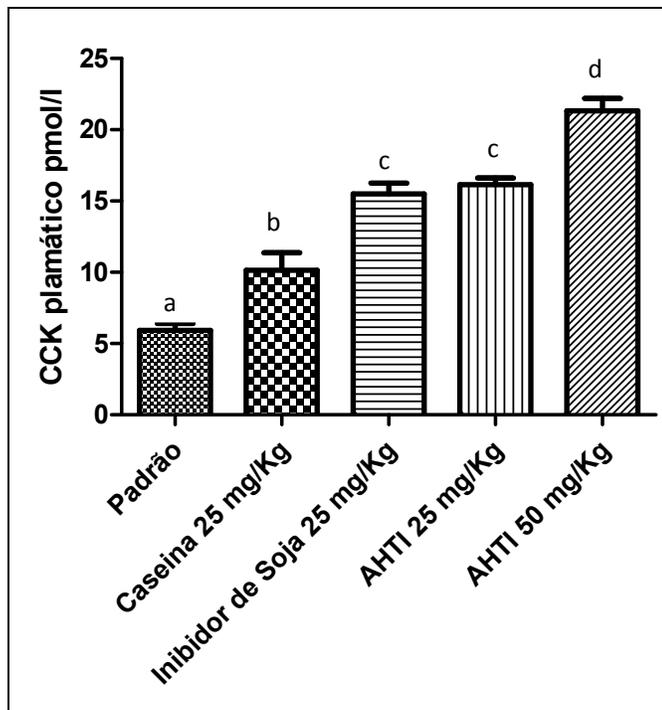
Albumina (g/dL)	4,48 ± 0,12 <sup>a</sup>	4,58 ± 0,15 <sup>a</sup>	4,96 ± 0,21 <sup>a</sup>	4,50 ± 0,15 <sup>a</sup>	4,41 ± 0,08 <sup>a</sup>	$f=3.358$ $p=0.088$
-----------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	------------------------

---

A dosagem dos parâmetros bioquímicos foi efetuada, apenas no último dia do experimento (14º dia). Dietas (100 g): Dieta Padrão (AIN-93G); Dieta Caseína (dieta Padrão AIN-93G suplementada por gavagem com Caseína 25 mg/kg); Dieta IS (dieta Padrão AIN-93G suplementada por gavagem com Inibidor de Tripsina de Soja 25 mg/kg); Dieta AHTI 25 (dieta Padrão AIN-93G suplementada por gavagem com AHTI 25 mg/kg) e Dieta AHTI 50 (dieta Padrão AIN-93G suplementada por gavagem com AHTI 50 mg/kg). Dados expressos em média ± desvio-padrão de grupo de seis animais. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos com  $p<0.05$ , ANOVA *one-way* com teste *post-hoc* de Tukey.  $f$ = cálculo do teste.

No estudo da dosagem de CCK plasmático, constatou-se, nos grupos tratados com AHTI, aumento do nível desse hormônio quando comparados com os grupos controles (Figura 22).

Figura 22 - Níveis plasmáticos de CCK em ratos *wistar* uma hora após a administração por gavagem de uma dose única de diferentes concentrações de inibidores de tripsina durante 14 dias.



Dietas (100 g): Dieta Padrão (ANI-93G); Dieta Caseína (dieta Padrão AIN-93G suplementada por gavagem com Caseína 25 mg/kg); Dieta IS (dieta Padrão AIN-93G suplementada por gavagem com Inibidor de Tripsina de Soja 25 mg/kg); Dieta AHTI 25 (dieta Padrão AIN-93G suplementada por gavagem com AHTI 25 mg/kg) e Dieta AHTI 50 (dieta Padrão AIN-93G suplementada por gavagem com AHTI 50 mg/kg). A dosagem de CCK foi realizada apenas no último dia do experimento (14º dia). Os resultados são expressos em pmol/L de CCK plasmático em média  $\pm$  desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos com  $p < 0.05$ , ANOVA *one-way* com teste *post-hoc* de Tukey.  $f =$  cálculo do teste.

## 6 DISCUSSÃO

Atualmente, há um crescente interesse da população em incluir, em seus hábitos alimentares, o consumo de alimentos que promovam benefícios à saúde, os chamados alimentos com propriedades nutracêuticas ou funcionais. Dentre tem-se se destacado o amendoim, que pode ser utilizado na forma torrada ou até mesmo em forma de sobremesas e doces, como a paçoca de amendoim.

Dentre os benefícios atribuídas ao amendoim, ressalta-se a sua capacidade em influenciar na redução do ganho de peso (ALPER; MATTES, 2002; RAJARAM; SABATE, 2006; MATTES; KRIS-ETHERTON; FOSTER, 2008). É provável que essa ação se deva pela indução da saciedade condicionada por diversos fatores e, dentre eles, destaca-se a presença de peptídeos e proteínas bioativas atuando de forma específica modulando a secreção de hormônios sacietogênicos como a CCK (KISSILEFF et al., em 1981; McLAUGHLIN; PEIKIN; BAILE, 1983; LIDDLE et al., 1984; GREEN; LEVAN; LIDDLE, 1986). Além do amendoim, para alguns de seus produtos derivados também tem sido investigada e comprovada a influência do seu consumo no controle de peso, como foi demonstrado para o óleo e para a manteiga de amendoim (SALES et al., 2005; COELHO et al., 2006; MATTES; KIRKMEYER; 2000). No entanto, são escassos os estudos com outros produtos e por isso, alguns deles vêm sendo pesquisados, como a paçoca de amendoim, pelo fato de ser muito produzida, consumida e, principalmente, pela sua relação com o aumento de peso, por se tratar de uma sobremesa hipercalórica.

Neste estudo ficou evidente que a paçoca de amendoim, assim como o amendoim *in natura*, o óleo e a manteiga de amendoim, provocaram redução do ganho de peso nos animais analisados (Figura 12) por promover a redução do consumo alimentar (Figura 11), provavelmente por causar saciedade. No primeiro experimento, os camundongos foram expostos à dieta hipercalórica, hiperlipídica e hiperglicídica rica em paçoca de amendoim por 14 semanas, sendo possível também avaliar a influência desse consumo nos níveis plasmáticos de Glicose, Triglicerídeos, Colesterol total e frações, Transaminase Glutâmica Oxalacética e Transaminase Glutâmica Pirúvica, além dos efeitos morfofisiológicos provocados pela exposição crônica à dieta. Pode-se observar que o nível de triglicerídios do grupo GP (55,83; SEM= 4,57) revelou-se elevado quando comparado ao grupo GH (26,83; SEM=

1,05) ( $p= 0,0048$ ;  $t= 0,225$ ), assim como o HDLc do GH (73,33; SEM= 4,26) que também aumentou quando comparado ao GP (56,17; SEM= 5,31) ( $p= 0,0305$ ;  $t= 2,518$ ). Estudos com amendoim também apresentaram aumento dos níveis de HDLc para os animais analisados (CINTRA et al., 2006). Efeito esperado levando em consideração as atribuições de saúde relacionadas ao amendoim por diminuir o risco de doenças cardiovasculares (HU et al., 1998; MUKUDEM-PETERSEN; OOSTHUIZEN; JERLING, 2005). Quanto ao aumento dos triglicerídeos é possível que tenha ocorrido essa elevação pelo fato de a dieta DH ser rica em paçoca de amendoim e se apresentar como hiperglicídica (CINTRA et al., 2006).

No mesmo experimento, com respeito às alterações histomorfológicas, especialmente a hiperplasia do pâncreas, identificadas no grupo GH (Figura 11 e 12), deve ter ocorrido pela abundância de proteínas na dieta, mesmo a dieta não sendo hiperproteica, já que o principal constituinte da paçoca de amendoim é o amendoim, semente rica em proteínas. Em adição, alguns estudos em que foram oferecidas dietas ricas em proteínas e em inibidores de tripsina mostraram, também, aumento do pâncreas em ratos (GREEN; LEVAN; LIDDLE, 1986). Entretanto, Sato et al., (2002) não observaram efeitos patológicos por exame histológico em pâncreas de camundongos que receberam o inibidor de tripsina sintético, *camostat*, após 14 dias de experimento, utilizando 0,1% de inibidor na dieta padrão. Dessa maneira, a dose e o tempo de exposição ao inibidor parecem ser determinantes em provocar os mais diversos efeitos morfológicos citados na literatura.

Em face desses resultados especulou-se sobre a possibilidade da presença do inibidor de tripsina em amendoim também estar contido na paçoca de amendoim e que este estivesse influenciando na redução do ganho de peso já que outros inibidores de tripsina, como: Inibidor de tripsina de Soja (SBTI) (McLAUGHLIN; PEIKIN; BAILE, 1983), Inibidores de tripsina de Fava Beans (VIDAL-VALVERDE et al., 1997) e Inibidores de tripsina de Batata (HILL et al., 1990; KOMARNYTSKY; COOK; RASKIN, 2011) provocaram efeito fisiológico influenciando na redução do ganho de peso.

Sendo assim, um novo inibidor de tripsina foi identificado e parcialmente purificado da paçoca de amendoim. Na literatura outros inibidores de amendoim já haviam sido purificados.

Para isso, a paçoca de amendoim foi submetida ao fracionamento de suas proteínas com sulfato de amônio e a fração correspondente a 30- 60 % de saturação (F2) apresentou maior atividade antitripsina, com 18,3 UI/mg de proteína (Figura 13). Essa fração foi, então, selecionada e aplicada à uma coluna de afinidade tripsina-Sepharose 4B (Figura 14), que reteve uma amostra proteica e apresentou 92% de inibição para a atividade catalítica da tripsina. A análise por SDS-PAGE do material retido na cromatografia de afinidade evidenciou, uma banca proteica predominante com massa molecular de, aproximadamente, 33 kDa. Na literatura existem relatos de outros inibidores de tripsina que já foram purificados, e contendo menores massas moleculares (TUR-SINAI, 1972; NORIOKA, OMICHI, IKENARA, 1982; MALEKI et al., 2003; DODO et al., 2004). Assim, esse novo inibidor de tripsina, parcialmente purificado da paçoca de amendoim, foi denominado de AHTI.

Semelhantes a outros inibidores de tripsina purificados e caracterizados (MACEDO; MATOS; MACHADO, 2000; OSMAN et al., 2002), o AHTI foi bastante termo-resistente, mantendo sua atividade inibitória total sobre a atividade da enzima tripsina, quando aquecido até 80 °C, reduzindo apenas em 8% sua atividade quando aumentada a temperatura para 100 °C. Esse fato explica o motivo pelo qual, surpreendentemente, o inibidor de tripsina presente na paçoca de amendoim não perdeu sua atividade (desnaturado) pelos processos industriais. A atividade inibitória frente a diferentes pHs foi alterada quando o inibidor foi submetido a valores de pH maiores que 4, com redução de 20% da inibição da atividade catalítica da enzima tripsina. Essa estabilidade é provavelmente, devido à presença de pontes dissulfeto entre suas cadeias polipeptídicas. Vale salientar que o domínio da base molecular e da estabilidade das proteínas é importante para o conhecimento básico, mas também para otimizar as aplicações biotecnológicas em nível industrial (GOMES et al., 2005). Essa alteração na atividade inibitória frente a valores de pH acima de 4, mostra um provável efeito amenizado da ação desse inibidor no intestino, já que, no lúmen dos animais testados, o pH encontra-se em torno de 7, sendo uma provável explicação para ausência dos efeitos citóxicos avaliados por meio dos parâmetros bioquímicos e morfológicos.

Quanto à cinética de AHTI, constatou-se que é do tipo competitiva de acordo com Dixon, et al., (1979), assim como outros inibidores de tripsina já descritos na

literatura (ARAÚJO et al., 2005; GOMES, 2004), entretanto a grande maioria dos inibidores de tripsina que apresenta inibição é do tipo competitiva.

AHTI apresentou uma constante de inibição ( $k_i$ ) de  $8.5 \times 10^{-11}$  M para a tripsina bovina, revelando ter uma maior afinidade por essa enzima quando comparada a outros inibidores já descritos na literatura, como o de sementes de *Dimorphandra mollis*, com  $k_i$  de  $5.3 \times 10^{-10}$  M (MACEDO; MATOS; MACHADO, 2000), o de sementes de *C. Paulina* (CPTI), com  $k_i$  de  $4.5 \times 10^{-8}$  M (PANDO et al., 1999) e o de *C Pallida*, com  $k_i$  de  $8.8 \times 10^{-10}$  M (GOMES, 2004). Norioka; Omichi; Ikenaka, (1982) purificaram e caracterizaram 5 inibidores de protease em amendoim (A-I, A-II, B-I, B-II, B-III), com valores de  $K_i$  variando entre 1,4 e  $4,4 \times 10^{-7}$  M. Assim, comparado ao AHTI, este se apresenta com maior afinidade para tripsina bovina.

Dessa forma, diante da redução do ganho de peso apresentada pelos camundongos *swiss* submetidos à dieta hipercalórica rica em paçoca de amendoim e a presença do inibidor de tripsina na paçoca de amendoim, foi realizado um segundo experimento com ratos *wister* submetidos à dieta com o inibidor (AHTI).

Nesse experimento, foi analisada a digestibilidade proteica em ratos com o consumo de paçoca de amendoim e AHTI parcialmente purificado, bem como a evolução no ganho de peso desses animais e dosados alguns parâmetros bioquímicos plasmáticos. A intenção foi saber se a redução do ganho de peso era devido a uma desnutrição provocada por uma menor disponibilidade proteica pela presença do AHTI ou se o efeito, na redução do ganho do peso dos animais era, de fato, em decorrência da saciedade. Como esperado, os animais submetidos à dieta suplementada com o AHTI, apresentaram menor ganho de peso comparados ao grupo controle e não foram identificadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos caseína e AHTI na digestibilidade proteica verdadeira e aparente. Dessa maneira, o AHTI não influenciou negativamente no aproveitamento das proteínas oferecidas pela dieta. Inclusive, alguns autores sugerem que há uma compensação da inibição da tripsina no intestino, ocorrendo uma estabilidade por um aumento da secreção enzimática e maior absorção de proteínas na parte distal do intestino (KROGDAHL; LEA; OLLI, 1994), podendo ter ocorrido o mesmo no experimento em questão.

Ademais, de acordo com os resultados demonstrados por Sgarbieri (1979), dietas com inibidor de tripsina purificado a partir de feijão Rosinha G2 (*Phaseolus vulgaris* L.) administrado em ratos *wistar* não tiveram efeito adicional sobre a digestibilidade proteica e, assim como é esperado, a atividade da protease intestinal não foi prejudicada pela dieta com inibidor de tripsina. Em contrapartida, segundo Peace et al., (1991), ratos também da linhagem *wistar* alimentados com SBTI apresentaram uma redução no ganho de peso, na eficiência alimentar, entretanto reduziram também a digestibilidade quando comparados com um grupo controle que recebia caseína.

No estudo em questão também foi avaliada a proteína plasmática albumina. É importante lembrar que a albumina é sintetizada pelo fígado, utilizando proteína dietética e que a sua presença no plasma cria uma força osmótica que mantém o volume de líquido dentro do espaço vascular, sendo um bom indicador do metabolismo proteico (GONZÁLEZ, 2009). Dessa forma, vale destacar que os animais não demonstraram variações estatísticas significativas entre os grupos para os níveis de albumina, corroborando o fato de que os animais não apresentaram desnutrição e perderam peso pela redução do consumo alimentar em função da saciedade.

Além da albumina, outros parâmetros foram dosados e apesar dos resultados bioquímicos com camundongos, dentre os vários analisados, terem mostrado diferença estatística significativa nos níveis de triglicerídeos e HDLc, para os experimentos desenvolvidos com ratos, apenas no primeiro experimento com o grupo PA foi possível também perceber o aumento dos triglicerídeos. Quanto aos outros parâmetros analisados não foi encontrada diferença importante entre os grupos, sobretudo os valores se mostraram dentro dos intervalos de normalidade, referência em outros biotérios (DANTAS et al., 2006, GIKNIS; CLIFFORD, 2008, MELO et al., 2012).

Outros estudos com ratos *wistar* (PEACE et al., 1991; KOMARNYTSKY; COOK; RASKIN, 2011) e também com camundongos *swiss* (ROY; SCHNEEMAN 1981) não revelaram alterações no perfil lipídico, bem como nas dosagens de glicose e transaminases (CAMPHELLO et al., 2009; RIBEIRO et al., 2010; KOMARNYTSKY; COOK; RASKIN, 2011). Quanto à TGO e TGP, se sabe que elas

possuem funções similares e sua elevação no soro sanguíneo tem sido amplamente utilizada como indicativo de hepatotoxicidade ou injúria hepatocelular (CAMPELLO et al., 2009). Mais um dado que se soma para afirmar que o AHTI não provocou efeito citotóxico nas doses e condições estudadas.

Em experimentos com suínos, para modelar humanos devido a semelhanças na fisiologia digestiva e anatômica, Garthoff et al., (2002) quando testaram a administração de uma preparação parcialmente purificada do inibidor de tripsina extraído da farinha de soja, com 511 mg/100g de matéria seca da dieta, enquanto que o grupo controle recebia alimentação sem inibidor, demonstraram que os grupos também não apresentaram diferenças entre os parâmetros bioquímicos testados.

Em face da redução do ganho de peso afetando os camundongos e ratos tratados com a paçoca de amendoim e o AHTI, respectivamente; menor consumo alimentar quando comparados ao grupo controle; ausências de alterações para os parâmetros bioquímicos e órgão analisado; além da falta de indícios de comprometimento do estado nutricional condicionada pela administração da paçoca e/ou do inibidor; acredita-se que a redução do ganho de peso realmente seja devido à saciedade. Esses resultados corroboram os encontrados para amendoim puro, amêndoas, castanhas, além dos alimentos derivados do amendoim que também influenciaram no controle do peso corporal (SABATÉ, 2003; GARCÍA-LORDA; RANGIL; SALAS-SALVADÓ, 2003; COELHO et al., 2006; MATTES; KIRKMEYER; 2000).

Sendo assim, a redução do ganho de peso verificado nos animais em estudo não sendo devido à desnutrição, mas sim à saciedade que supostamente estaria provocando menor consumo alimentar, condicionada pela administração do inibidor de tripsina (AHTI); poderia ser devido ao aumento plasmático de CCK, que tem efeito sacietogênico e relação com os inibidores de tripsina. Dessa maneira, este poderia ser o mecanismo do candidato, responsável pela diminuição do ganho de peso em ratos e camundongos tratados com AHTI, bem como já demonstrado em outros estudos com outros inibidores de tripsina (HILL et al., 1990; KOMARNYTSKY; COOK; RASKIN, 2011; NAKAJIMA et al, 2011; CHEN et AL, 2012). Essa condição pode ser explicada por meio da sinalização por *feedback* positivo entre o inibidor de tripsina e o hormônio sacietogênico CCK. Assim, esse hormônio atuando no núcleo

arqueado produziria um efeito supressor da fome, haja vista a diminuição do consumo alimentar existente nos experimentos com camundongos e ratos.

Para comprovar a hipótese sugerida do efeito da redução do ganho de peso decorrente do consumo de dietas rica em paçoca de amendoim e em AHTI ser devido à saciedade promovida pelo aumento plasmático de CCK, foi realizado o **terceiro** experimento para dosar os níveis plasmáticos de CCK quando os animais eram submetidos às dietas já citadas acima. Dessa maneira, foi possível detectar um aumento significativo de CCK plasmático em ratos suplementados com AHTI nas concentrações de 25 mg/Kg e 50 mg/Kg, quando comparados com os grupos Padrão, Caseína e SBTI, que é um conhecido inibidor de tripsina com ação sacietogênica (McLAUGHLIN; PEIKIN; BAILE, 1983; GARTHOFF et al, 2002), revelando que o AHTI é uma proteína com potencial efeito sacietogênico.

Esses resultados também foram encontrados em animais submetidos a dietas contendo um concentrado de inibidores de protease (PPIC) (100mg/kg) (KOMARNYTSKY; COOK; RASKIN, 2011), SBTI (100 mg/ kg) (McLAUGHLIN; PEIKIN; BAILE, 1983), extrato proteico de batata (Potein) (100 mg/ kg; 200 mg/ kg e 400 mg/ kg) (NAKAJIMA et al., 2011) e Potein® (1,0 e 1,5 g/Kg) ( CHEN et al., 2012) todos administrados por gavagem e em humanos submetidos à dieta com um inibidor de proteinase extraído de batata (POT II) (HILL et al., 1990).

Ainda relacionado ao estudo, a redução do consumo alimentar foi maior na 1<sup>a</sup> e na 2<sup>a</sup> hora após administração dos inibidores por gavagem, onde o grupo AHTI (25 mg/kg) apresentou redução do consumo alimentar de 58.3% e 39.1% na 1<sup>a</sup> e na 2<sup>a</sup> hora, respectivamente, e o AHTI (50 mg/kg) indicou redução do consumo alimentar de 56.8% e 54.5% na 1<sup>a</sup> e na 2<sup>a</sup> hora, respectivamente, mostrando assim uma maior redução do consumo alimentar quando comparados com os grupos SBTI (25 mg/ kg; com redução do consumo alimentar de 35.7% e 53% na 1<sup>a</sup> e na 2<sup>a</sup> hora respectivamente), C (25 mg/ kg; com redução do consumo alimentar de 27.5% e 22.1% na 1<sup>a</sup> e na 2<sup>a</sup> hora respectivamente) e P (com redução do consumo alimentar de 16.1% e 25.79% na 1<sup>a</sup> e na 2<sup>a</sup> hora respectivamente). No entanto, após 18 horas a redução do consumo alimentar não apresentou diferença estatística significativa nos grupos analisados.

Esses resultados são similares aos encontrados com a administração oral do Potein, em que 3 concentrações diferentes foram testadas (100 mg/kg, 200mg/kg e 400mg/kg) e de SBTI (100 mg/ kg), com diminuição do consumo alimentar entre a 1<sup>a</sup> e a 3<sup>a</sup> hora (NAKAJIMA et al., 2011). Igualmente, quando administrado em ratos o produto Potein®, o qual também provocou redução do consumo alimentar, entretanto em quantidade bem maiores (1,0 e 1,5 g/Kg) (CHEN et al., 2012). Em outros estudos como o com PPIC, em 10 dias de experimentos, houve uma diminuição cumulativa do consumo alimentar (KOMARNYTSKY; COOK; RASKIN, 2011). Essa diminuição do consumo alimentar deve-se a presença do inibidor de tripsina que estaria proporcionando um efeito sacietogênico aos animais, e pelos dados se constata que esse efeito se dá entre a 1<sup>a</sup> e a 3<sup>a</sup> hora após o consumo do inibidor de tripsina.

Quanto às concentrações séricas de CCK analisadas nos animais estudados, foram detectados níveis crescentes nos grupos testes, quando comparados ao grupo padrão (5.92 pmol/L  $\pm$  1.15) Os maiores valores foram para os grupos submetidos a dietas com AHTI 25 e 50 mg/ kg de 16.15 pmol/L  $\pm$  1.13 e 21.33 pmol/L  $\pm$  2.12 respectivamente, um aumento de quase 250% com a administração do AHTI 50 mg/ kg. Tendo sido detectado níveis de CCK para o grupo submetido à dieta com o SBTI (25 mg/kg) de 15.52 pmol/L  $\pm$  1.82 . Alguns estudos na literatura revelam que também houve aumento plasmático de CCK quando ratos foram submetidos a dietas com proteína e inibidor de tripsina, dietas essas suplementadas como 100 mg/kg de caseína e 100 mg/kg de PPIC com resultados de aumento de, aproximadamente, 2 para 4 pmol/L de CCK plasmático, após 15 minutos (KOMARNYTSKY; COOK; RASKIN, 2011).

Estudos com inibidores de protease sintéticos (20 mg/kg) também induziram o aumento significativo de CCK basal de 2.59 pmol/l para 27.6 pmol/l na 1<sup>a</sup> hora e um decréscimo para 15.8 pmol/l na 2<sup>a</sup> hora (YAMAMOTO; SHIROHARA; OTSUKI, 1998).

Ademais em humanos, o efeito de POT II, o qual aumenta a liberação de CCK, foi avaliado sobre o consumo de alimentos em 11 indivíduos magros. Eles receberam 1,5 g POT II em uma sopa rica em proteínas (70 kcal). Aqueles que consumiram a sopa sozinha conduziram a uma redução não significativa de 3% no

consumo de energia. A adição de 1,5 g POT II na sopa reduziu significativamente o consumo de energia em 17,5% (HILL et al., 1990). Os resultados com AHTI demonstram grande potencial para o seu uso visando ao efeito sacietogênico, quando comparados a outros na literatura (inibidores de tripsina de soja e de batata) podendo vir a ser usado como um possível agente para a prevenção e/ou tratamento da obesidade.

Nesse mesmo experimento realizado para dosagem de CCK plasmático, também foram analisados outros parâmetros bioquímicos e todos se apresentaram dentro do intervalo de referência para ratos *wistar*, assim como no experimento anterior também realizado com ratos. Pode-se perceber que, os grupos testes, com a administração dos inibidores de tripsina de soja e de amendoim (AHTI) não mostraram diferenças estatísticas significativas quando comparadas entre os grupos.

No entanto, é de suma importância que estudos possam ser efetivados, visando determinar doses dependentes de inibidores de tripsina que atuem aumentando o nível plasmático de CCK e conseqüentemente provoquem saciedade, bem como o tempo de uso. Também são necessárias pesquisas que expliquem melhor o aumento da expressão de CCK condicionada pela administração oral de inibidores de tripsina.

## **7 CONCLUSÃO**

A análise dos resultados encontrados mostrou que a presença do inibidor de tripsina na paçoca de amendoim não foi esperada devido a todo o processo industrial a que o alimento é condicionado. O fato de o AHTI ser termo-resistente explica por que ele se manteve ativo após todo processo industrial.

Sabe-se que o AHTI apresentou menor atividade em pH maior que 4, levando a crer que houve uma possível perda de atividade inibitória quando presente no lúmen intestinal dos animais em estudo, visto que o pH é em torno de 7, essa perda da atividade do inibidor no lúmen pode ser um fator relevante para explicar por que os animais não apresentaram alterações histomorfológicas tampouco bioquímicas significativas, sendo assim, tendo sido atenuada uma provável citotoxicidade do AHTI.

Tanto em camundongos *swiss* como em ratos *wistar* submetidos à dieta com paçoca de amendoim e com o inibidor de tripsina de paçoca de amendoim parcialmente purificado, respectivamente, foi possível verificar menor ganho de peso e menor consumo alimentar quando comparados ao grupo controle.

Os resultados bioquímicos e da digestibilidade proteica aparente e verdadeira indicam que os camundongos e ratos não revelaram perda proteica e por isso os animais não estariam desnutrindo devido ao efeito do tratamento dietético. Esses resultados evidenciam que nesses animais o AHTI provocou saciedade, condição que fez com que os animais diminuíssem o consumo alimentar e, conseqüentemente, tivessem menor ganho de peso.

Quando o AHTI foi comparado com outras fontes de proteína (caseína e SBTI) em dose semelhante, ele demonstrou um maior efeito na supressão do consumo alimentar especialmente durante a 1<sup>a</sup> h após a sua administração, indicando assim maior poder sacietogênico.

Ademais, os ratos que ingeriram o inibidor de tripsina de paçoca de amendoim tiveram seus níveis de CCK plasmáticos elevados quando comparados aos demais grupos, aventando a hipótese de que esse efeito sacietogênico ocorra por meio de mecanismos de *feedback* em nível luminal e sanguíneo, aumentando o nível plasmático de CCK, conseqüentemente, ocorrendo efeitos fisiológicos dos quais se destaca menor consumo alimentar e, por conseguinte, menor ganho de peso.

## REFERÊNCIAS

- ALPER, C. M.; MATTES, R. D. The effects of chronic peanut consumption on energy balance and hedonics. **Int J Obes**, [s.l.], v. 26, p. 1129-1137, 2002.
- AMAYA, H.; ACEVEDO, E.; BRESSANI, R. Efecto del recalentamiento sobre la disponibilidad de hierro y valor nutritivo de la proteína del frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) cocido. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, [s.l.], v. 16, n. 2, p. 222-237, 1991.
- ANGELIS, R. C. de. Conceitos de nutrientes não tradicionais. **Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde**. Belo Horizonte: Atheneu, 2001.
- ARAÚJO, C.L., BEZERRA, I.W.L., DANTAS, I.C., LIMA, T.V.S., OLIVEIRA, A.S., MIRANDA, M.R.A., LEITE, E.L., SALES, M.P. Biological activity of proteins from pulps of tropical fruits. **Food Chemistry**, v. 85, p. 107–110, 2004.
- ARAÚJO, C. L., BEZERRA, I.L.W., OLIVEIRA, A.S., MOURA, F.T., MACEDO, L.L.P., GOMES, C.E.M., BARBOSA, A.E.A.D., MACEDO, F.P., SOUZA, T.M.S., FRANCO, O.L., BLOCH-J, C., SALES, M.P. In Vivo Bioinsecticidal Activity toward *Ceratitis capitata* (Fruit Fly) and *Callosobruchus maculatus* (Cowpea Weevil) and *in Vitro* Bioinsecticidal Activity toward Different Orders of Insect Pests of a Trypsin Inhibitor Purified from Tamarind Tree (*Tamarindus indica*) Seeds . **J. Agric. Food Chem.** 53, p 4381-4387, 2005.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods for Analysis of the Association of official Analytical Chemists. 14. ed. Arlington: AOAC International, 1984.
- AZAGURY, D. E.; LAUTZ, D. B. Obesity Overview: Epidemiology, Health and Financial Impact, and Guidelines for Qualification for Surgical Therapy. **Gastrointest Endosc Clin N Am.**, [S.I.], v. 21, n. 2, p. 189-201, 2011.
- BARDRAM, L.; HILSTED, L.; REHFELD, J. F. Cholecystokinin, gastrin and their precursors in pheochromocytomas. **Acta Endocrinol.**, [S.I.], v. 120, p. 479–84, 1989.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Evolutionary lines of cysteine peptidases. **Biol Chem.**, [S.I.], v. 382, n. 5, p. 727-733, 2001.
- BEINFELD, M. C.; PALKOVITS, M. Distribution of cholecystokinin (CCK) in the rat lower brain stem nuclei. **Brain Res.**, [S.I.], v. 238, p. 260-265, 1982.
- BODE, W.; HUBER, R. Natural Protein Proteinase Inhibitor and their Interaction with Proteinases. **Eur. J. Biochem.**, [S.I.], v. 204, p. 433-451, 1992.
- BRADFORD, M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [S.I.], v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução – RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003 - Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Disponível em [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1c2998004bc50d62a671ffbc0f9d5b29/RDC\\_N\\_360\\_DE\\_23\\_DE\\_DEZEMBRO\\_DE\\_2003.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1c2998004bc50d62a671ffbc0f9d5b29/RDC_N_360_DE_23_DE_DEZEMBRO_DE_2003.pdf?MOD=AJPERES). Acesso em: - abril de 2012.

BRASIL. ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução – RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003 - Tabela de Valores de Referência para Porções de Alimentos e Bebidas Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. Disponível em [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d12c9e804745947f9bf0df3fbc4c6735/RDC\\_359.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d12c9e804745947f9bf0df3fbc4c6735/RDC_359.pdf?MOD=AJPERES). Acesso em: - abril de 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância de Fatores de Risco e Proteção Para Doenças Crônicas Por Inquérito Telefônico**. 2011. Disponível em: (<<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/4718/162/quase-metade-da-populacao-brasileira-esta-acima-do-peso.html>>). Acesso em: - abril de 2012.

BRENNER, L.; CORP, E. S.; GIBBS, J. et al., Trypsin inhibitor and maternal reunion increase plasma cholecystokinin in neonatal rats. **Peptides**, [S.l.], v. 13, p. 939-941, 1992.

BRUNE, M.F.S.S., PINTO, M.O., PELUZIO, M.C.G., MOREIRA, M.A., BARROS, E.G. Biochemical and nutritional evaluation of a soybean line lacking the Kunitz trypsin inhibitor and lectins. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 30, n. 3, p. 657-663, 2010.

BRZIN, J; KIDRIC, M. Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions. **Biotechnol. Genet. Eng. Rev.**, [S.l.], v. 13, 421-467, 1995.

BURTON-FREEMAN, B. Dietary fiber and energy regulation. **J Nutr.**, [S.l.], v. 130, 272-275, 2000.

CÂMARA, G.M.S.; GODOY, O.S.; FONSECA, H. **Amendoim: produção, préprocessamento e transformação agroindustrial**. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1982. 83 p. (Série Extensão Agroindustrial, n. 3).

CAMPELLO, C. C. et al. Performance and serum parameters of rats fed on diets containing raw full-fat soybeans. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, [S.l.], v. 46, n. 3, p. 188-198, 2009.

CAVALCANTI, M. S. M. et al. Characterization of a kunitz trypsin inhibitor with one disulfide bridge purified from *Swartzia pickellii*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, [S.l.], v. 29, p. 635-639, 2002.

CHEN, W. et al. Suppressive effect on food intake of a potato extract (Potein®) involving cholecystokinin release in rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, [S.l.], v. 76, n. 6, p. 1104-1109, 2012.

CHISHOLM, A. et al. Cholesterol lowering effects of nuts compared with a canola oil enriched cereal of similar fat composition. **Nutr Metabol et Cardiovascular diseases**, [S.l.], v. 15, n. 5, p. 284-292, 2005.

CINTRA, D. E. C. et al. Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout, or chicken skin. **Nutrition**, [S.l.], v. 22, n. 2, p.197–205, 2006.

COELHO, S. B. et al., Effects of peanut oil load on energy expenditure, body composition, lipid profile, and appetite in lean and overweight adults. **Nutrition**, [S.l.], v. 22, n. 6, p. 585-592, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**. Brasília: CONAB, ago. 2012.

COUTINHO, W. F. Consenso Latino Americano de Obesidade. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, [S.l.], v. 43, n. 1, p. 21-67, fev. 1999.

CRAWLEY, J. N.; CORWIN, R. L. Biological Actions of Cholecystokinin. **Peptides**, [S.l.], v. 15, n. 4, p. 731-755, 1994.

DANTAS, J. A. et al. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Sci. Health Sci.**, Paraná, v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.

DESCHENES, R. J. et al. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding rat preprocholecystokinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, [S.l.], v.81, n. 3, p. 726-730, 1984.

DEVITT, A. et al. Appetitive and Dietary Effects of Consuming an Energy-Dense Food (Peanuts) with or between Meals by Snackers and Nonsnackers. **Journal of Nutrition and Metabolism**, [S.l.], v. 2011, p. 1-9, 2011.

DIXON, M. et al. Inhibition and Activation. In: PRESS, A. **Enzymes**. New York: [s.n.], p. 332-381, 1979.

DODO, H. W. et al., cDNA clone of a putative peanut (*Arachis hypogaea* L.) trypsin inhibitor has homology with peanut allergens Ara h 3 and Ara h 4. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [S.l.], v. 52, n. 5, 2004.

DUFRESNE, M.; SEVA, C.; FOURMY, D. Cholecystokinin and gastrin receptors. **Physiol Rev**, [S.l.], v. 86, p. 805–847, 2006;

FOLSCH, U.R. et al. Role of cholecystokinin in the negative feedback control of pancreatic enzyme secretion in conscious rats. **Gastroenterology**, [S.l.], v. 92, n. 2, p. 449-458, 1987.

FREITAS, F. O.; MORETZSOHN, M.C; VALLS; J. F. M. Genetic variability of Brazilian Indian landraces of *Arachis hypogaea* L. **Genet Mol Res.** [S.l.], v. 6, n. 3, p. 675-684, 2007.

FREZZA, E. E.; WACHTEL, M. S.; EWING, B. T. The impact of morbid obesity on the state economy: an initial evaluation. **Surg Obes Relat Dis.**, [S.l.], v. 2, n. 5, p. 504-508, 2006.

GARCÍA-LORDA, P.; MEGIAS RANGIL, I.; SALAS-SALVADÓ, J. Nut consumption, body weight and insulin resistance. **European Journal of Clinical Nutrition**, [S.l.], v. 57, n.1, p. 8-11, 2003.

GARTHOFF, L. H. et al. Pathological evaluation, clinical chemistry and plasma cholecystokinin in neonatal and young miniature swine fed soy trypsin inhibitor from 1 to 39 weeks of age. **Food Chem Toxicol.** [S.l.], v 40, n. 4, p. 501-516, 2002.

GEBAUER, S. K. et al., Effects of pistachios on cardiovascular disease risk factors and potential mechanisms of action: a dose-response study. **Am J Clin Nutr.**, [S.l.], v. 88, n.3, p.651-659, 2008.

GIKNIS, M. L. A.; CLIFFORD C. B. **Clinical Laboratory Parameter for CrI: WI** (Han). 2008. Disponível em: <[http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm\\_rm\\_r\\_Wistar\\_Han\\_clin\\_lab\\_parameters\\_08.pdf](http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm_rm_r_Wistar_Han_clin_lab_parameters_08.pdf)>. Acesso em: 05 ago. 2012.

GOMES, C. E. M. et al., Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (Cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (Fruit fly). **Plant physiology and biochemistry**, [S.l.], v. 43, n. 12, p. 1095-1102, 2005.

GOMES, C. E. M. Purificação, Caracterização e Atividade Bioinseticida de um Inibidor de Sementes de *Crotalaria pallida*, 2004, 74 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2004.

GONZÁLEZ, F. H. D. Ferramentas de diagnóstico e monitoramento das doenças metabólicas. **Brazilian Animal Science**, Goiás, 2009.

GREEN, G. M.; LEVAN, V. H.; LIDDLE, R. A. Plasma cholecystokinin and pancreatic growth during adaptation to dietary protein. **Am J Physiol**, [S.l.], v. 251, n.1, p. 70-74, 1986.

GRIEL, A. E. et al. Improve Diet Quality with Peanut Consumption. **J Am Coll Nutr**, [S.l.], v. 23, n. 6, p. 660-668, 2004.

HALWARD, T. M. et al. Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germ-plasm resources of cultivated peanut and related wild species. **Genome**, [S.l.], v. 34, n. 6, p.1013-1020, 1991.

HILL, A. J. et al. Oral administration of proteinase inhibitor II from potatoes reduces energy intake in man. **Physiology & Behavior**, [S.I.], v. 48, n. 2, p. 241–246, 1990.

HU, F. B. et al. Frequent nut consumption and risk of coronary heart disease in women: prospective cohort study. **BMJ**, [S.I.], v. 317, n. 7169, p. 1341-1345, 1998.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009**: antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010.

IVY, A. C.; OLDBERG, E. A hormone mechanism for gallbladder contraction and evacuation. **Am. J. Physiol**, [S.I.], v.65, p.599-613, 1928.

JIANG, R.; JACOBS, J. R.; MAYER-DAVIS, E. Nut and seed consumption and inflammatory markers in multi-ethnic study of atherosclerosis. **Am J Epidemiol**, [S.I.], v. 263, n. 3, p. 222-231, 2006.

KARL-HEINZ, H. Cholecystokinin- and secretin-releasing peptides in the intestine-a new regulatory interendocrine mechanism in the gastrointestinal tract. **Regulatory Peptides**, [S.I.], v. 73, p. 89-94, 1998.

KISSILEFF, H.R., Pi-SUNYER, F.X., THORNTON, J., SMITH, G.P. C terminal octapeptide of cholecystokinin decreases food intake in man. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 34, p.154–160, 1981.

KOIWA, H.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. **Trends Plant Sci.**, [S.I.], n. 2, 379-384, 1997.

KOMARNYTSKY, S.; COOK, A.; RASKIN, I. Potato protease inhibitors inhibit food intake and increase circulating cholecystokinin levels by a trypsin-dependent mechanism. **Int J Obes (Lond)**, [S.I.], v. 35, n. 2, p. 236-243, 2011.

KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomia del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, [S.I.], v. 8, p. 1-186, 1994,

KRIS-ETHERTON, P. M. et al. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. **Am J Clin Nutr**, [S.I.], v. 70, n. 6, p. 1009-1015, 1999.

KROGDAHL, A.; LEA T. B.; OLLI J. J. Soybean proteinase inhibitors affect intestinal trypsin activities and amino acid digestibilities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Camp. Biochem. Physiol.** [S.I.], v. 107, n.1, p. 215-219, 1994.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.**, [S.I.], v. 227, p. 680-685, 1970.

LIDDLE, R.A., GOLDFINE, I.D., WILLIAMS, J.A. Bioassay of plasma cholecystokinin in rats: effects of food, trypsin inhibitor, and alcohol. **Gastroenterology**, v. 87, n. 3, p. 542-549, 1984.

LIDDLE, R. A. Cholecystokinin cells. **Annu. Rev. Physiol**, [S.l.], v. 59, p. 221-242, 1997.

LOU, H. et al. Polyphenols from peanut skins and their free radical-scavenging effects, **Phytochemistry**, [S.l.], v. 65, p. 2391–2399, 2004.

LYMAN, R. L.; LEPKOVSKY, S. The effect of raw soybean meal and trypsin inhibitor diets on pancreatic enzyme secretion in the rat. **J Nutr**, [S.l.], v. 62, p. 264-284, 1957.

MACEDO, M. L. R.; MATOS, D. G. G.; MACHADO, O. L. T. Trypsin inhibitor from *dimorphandra mollis* seeds: purification and properties, **Phytochemistry**, [S.l.], v. 54, p.553-558, 2000.

MACHADO, J. G. de C. F. Análise das estratégias de marketing das indústrias de processamento de amendoim da região de Tupã-SP. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 44. 2006, Fortaleza, Ceará, Brasil. **Anais...** Fortaleza: Sober, 2006. CD-ROM.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause**: alimentos, nutrição e dietoterapia. 9. ed. São Paulo: Roca, 1998, 957 p.

MALEKI, S. J. et al. The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [S.l.], v. 112, n. 1, 2003.

MARCHIORI, V. Amendoim: Propriedades Funcionais. **ABICAB**, 2011. Disponível em: <<http://www.abicab.org.br/file/Amendoim%20Funcional.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2012.

MARGIS, R.; REIS, E. M.; VILLET, V. Structural and Phylogenetic Relationships among Plant and Animal Cystatins. **Arch. Biochem. Biophys**, [S.l.], v. 359, n. 1, p. 24-30, 1998.

MARTINS, R. Amendoim: safra 2008/09 e perspectiva para 2009/10, **Análises e Indicadores do Agronegócio**. [S.l.], v. 5, n.1, janeiro 2010.

MATTES, R. D.; KIRKMEYER, S. V. Effects of food attributes on hunger and food intake. **Int J Obes.**, [S.l.], v. 24, n. 9, p. 1167-1175, set. 2000.

MATTES, R. D.; KRIS-ETHERTON, P. M.; FOSTER, G. D. Impact of peanuts and tree nuts on body weight and healthy weight loss in adults. **J Nutr**. [S.l.], v. 138, n. 9, p. 1741-1745, 2008.

MCLAUGHLIN, C. L.; PEIKIN, S. R.; BAILE, A. A. Trypsin inhibitor effects on food intake and weight gain in Zucker rats. **Physiology & Behavior**, [S.l.], v. 31, n. 4, p. 487-49, 1983.

MELO, M. G. D. et al. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, [S.l.], vol. 8, n. 4, 2012.

MUKUDDER-PETERSEN, J.; OOSTHUIZEN, W.; JERLING, J. C. A systematic review of the effects of nuts on blood lipid profiles in humans. **J Nutr**, [S.l.], v. 135, n. 9, 2082-2089, 2005.

MUST, A. et al. The Disease Burden Associated With Overweight and Obesity. **JAMA**, [S.l.], v. 282, n. 16, p. 1523-1529, 1999.

NAKAJIMA, S. et al. Potato Extract (Potein) Suppresses Food Intake in Rats through Inhibition of Luminal Trypsin Activity and Direct Stimulation of Cholecystokinin Secretion from Enteroendocrine Cells. **J Agr Food Chem**, [S.l.], v. 59, n. 17, p. 9491-9496, 2011.

NEURATH, H. The regulation of protease action: An Overview. In: AVILES, F. **Innovations in proteases and their inhibitors**. 10. ed. Berlin: Gruyter, 1993.

NORIOKA, S.; OMICHI, K.; IKENAKA, T. Purification and Characterization of Protease Inhibitors from Peanuts (*Arachis hypogaea*). **J Biochem**, [S.l.], v. 91, n.4, p.1427-1434, 1982.

OLIVEIRA, A. S. et al. Identification of a Kunitz-type Proteinase Inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds with insecticidal properties and double activity. **J. Agric. Food Chem.**, [S.l.], v. 55, n. 18, p. 7342-7349, 2007.

OLIVEIRA, A. S.; XAVIER-FILHO, J.; SALES, M. P. Cysteine Proteinase and Cystatins. **Braz. Arch. Biol. Technol.** [S.l.], v. 46, n. 1, p. 91-104, 2003.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Informe de una consulta mixta de expertos OMS/FAO. **Dieta, Nutrición y Prevención de Enfermedades Crónicas**. Ginebra: OMS. 2003. (Serie de Informes Técnicos, n. 916).

PANDO, L. A. et al. Isolation and characterization of a new trypsin inhibitor from *Crotalaria paulina* seeds. **IUBMB Life**, [S.l.], v. 48, n.5, p. 519-23, 1999.

PEACE, R. W. et al. Effects of soybean trypsin inhibitors and dl-methionine on growth and serum parameters in young rats. **Nutrition Research**, [S.l.], v. 11, n. 10, p. 1197-1208, 1991.

POWERS, J. C. et al. Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases. **Chem. Rev.**, [S.l.], v. 102, p. 4639-4750, 2002.

RAJARAM, S.; SABATE, J. Nuts, body weight and insulin resistance British. **Journal of Nutrition**, [S.l.], v. 96, n. 2, p. 79-86, 2006.

REHFELD, J. F. et al. Gastrin and cholecystokinin in pituitary neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, [S.n.], v. 81, n. 6, p.1902-1905, 1984.

RIBEIRO, J. K. C. et al. New properties of the soybean trypsin inhibitor: Inhibition of human neutrophil elastase and its effect on acute pulmonary injury. **European Journal of Pharmacology**, [S.l.], v. 644, p. 238–244, 2010.

RICHARDSON, M. The proteinase inhibitors of plants and micro-organisms. **Phytochemistry**, Inglaterra, v. 16, 1997.

ROY, D. M., SCHNEEMAN, B. O. Effect of soy protein, casein and trypsin inhibitor on cholesterol, bile acids and pancreatic enzymes in mice. **The Journal of Nutrition**, [S.l.], v. 111, n. 5, p. 878-885, 1981.

RYAN, C. A. Protease inhibitors in plants: genes for Improving defenses against insects and pathogens. **Annu. Re. Phytopathol.** [S.l.], v. 28, p. 425-449, 1990.

SALES, L. R. et al. Efeito dos óleos de amendoim, açafrão e oliva na composição corporal, metabolismo energético, perfil lipídico e ingestão alimentar de indivíduos eutróficos normolipidêmicos. **Rev. Nutri.**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 499-511, 2005.

SANTOS, E. A. et al. Affinity Chromatography as a Key Tool to Purify Protein Protease Inhibitors from Plants (2012). **Affinity Chromatography**. Disponível em: < <http://www.intechopen.com/books/howtoreference/affinitychromatography/affinity-chromatography-as-a-key-tool-to-purify-protease-inhibitors-from-plants>>. Acesso em: 01 maio 2012.

SANTOS, J. F. et al. Resistência à mancha preta em populações F4 selecionadas de cruzamentos entre o amendoim cultivado em um afidiplóide de *Arachis*. *Bragantia*: Campinas, v. 70, p. 512-518, 2011.

SATO, N. et al. Different effects of oral administration of synthetic trypsin inhibitor on the pancreas between cholecystokinin-A receptor gene knockout mice and wild type mice. **The Japanese journal of pharmacology**, [S.l.], v. 89, n. 3, p. 290-295, 2002.

SCHULER, T. H. et al. Insect-resistant transgenic plants. **Trends Biotechnol.** [S.l.], v. 16, p. 168-175, 1998.

SGARBIERI, V. C. Propriedades físico-químicas e nutricionais de proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) variedade Rosinha G2. Universidade de Campinas, 1979.

SHERIDAN, M. J. Pistachio nut consumption and serum lipid levels. **J Am Coll Nutr**, [S.l.], v. 26, n. 2, p.141-148, 2007.

SICHERI, R. et al. Recomendações de alimentação e nutrição saudável para a população Brasileira. **Arq Bras Endocrinol Metab**, [S.l.], v. 44, n. 3, p. 227-232, 2000.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Revista de Nutrição**, Campinas, [S.l.], v. 13, n. 2, jan./abr., 2000.

SOLCIA, E. et al., Revised Wiesbaden classification of gut endocrine cells. **Rend. Gastroenterol.** [S.l.], v. 5, p.13-16, 1973.

SPINELLI, M. O. et al. Comparação dos parâmetros bioquímicos de camundongos criados em diferentes condições sanitárias. **Scientia Plena.**, [S.l.], v. 8. n. 1, 2012.

SPOSITO, Andrei C. et al. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.** [online]. 2007, vol.88, suppl.1, pp. 2-19. ISSN 0066-782X.<http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2007000700002>.

THE PEANUT INSTITUTE. Eating Peanuts & Peanut Butter to Improve Heart Disease Risk. USA, v. 7, n. 2, 2004.

TRAORET, C. J. et al., Peanut digestion and energy balance. **Int J Obes.**, [S.l.], v. 32, n. 2, p. 1-7, 2008.

TURKELSON, C. M.; REEVE, J. R. JR.; SOLOMON, T.E. Low immunoreactivity of canine cholecystokinin-58. **Gastroenterology**, [S.l.], v. 99, p.646-651, 1990.

TUR-SINAI, A. et al. A basic trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from groundnuts (*Arachis hypogaea*). **Biochimica et Biophysica Acta.** [S.l.], v. 263, n.3, p. 666-672, 1972.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 4. ed. Campinas: [s.n.], 2011. 113 p.

USDA. Nutrient database for standard reference. Nutrient Data Laboratory disponível em: <[www.nal.usdagov/fnic/foodcomp](http://www.nal.usdagov/fnic/foodcomp)>. Acesso em: 15. nov. 2010.

USSUF, K. K.; LAXMI, N. H.; MITRA, R. Proteinase inhibitors: Plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. **Curr. Sci.**, [S.l.], v. 80, p.847-853, 2001.

VACANTI, L. J. et al. Síndrome metabólica secundária. **Revista da sociedade de cardiologia**. São Paulo, v. 14, n. 03, p. 636-645, 2004.

VALENTE, F. L. S. "Segurança Alimentar e Nutricional: transformando natureza em gente" in: VALENTE, F. L. S. **Direito Humano à Alimentação – desafios e conquistas**. São Paulo, Cortez, 2002. p. 103-136.

VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E. New species of *Arachis* L. (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. **Bonplandia**, [S.l.], v. 14, p. 35-64, 2005.

VENKATACHALAM, M.; SATHE, S.K. Chemical composition of selected edible nut seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.n.], v. 54, n. 13, p. 4705-4714, 2006.

VIDAL-VALVERDE, C. et al. Influence of Processing on Trypsin Inhibitor Activity of Faba Beans and Its Physiological Effect. **J. Agric. Food Chem**, [S.l.], v. 45, p. 3559-3564, 1997.

WILLIAMS, J. A. Cholecystokinin: a hormone and a neurotransmitter. **Biomed. Res.** [S.l.], v. 3, p.107-121, 1982.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. **Lancet**, [S.l.], v. 363, n. 9403, p. 157-163, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Obesity and overweight. Geneva: [s.n.], 2004. Disponível em: <<http://www.who.int/dietphysicalactivity>

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. World Health Statistics. Geneva: [s.n.], 2012. Disponível em: <[http://www.searo.who.int/LinkFiles/Data\\_and\\_Statistics\\_WHS-2012.pdf](http://www.searo.who.int/LinkFiles/Data_and_Statistics_WHS-2012.pdf)>. Acesso em: 29 novembro 2012.

YAMAMOTO, M; SHIROHARA, H; OTSUKI, M. CCK-, secretin-, and cholinergic-independent pancreatic fluid hypersecretion in protease inhibitor-treated rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v. 274, p. 406-412, 1998.

YOUNG, N. D.; WEEDEN, N. F.; KOCHERT, G. Genome mapping in legumes (Family Fabaceae). In: **Genome mapping in plants**. Landes; Edited by Paterson AH, 1996.