



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI  
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO-PRPG  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – PPGAN

LAYS ARNAUD ROSAL LOPES

**EFEITO HIPOCOLESTEROLEMIZANTE E HEPATOPROTETOR DO  
FEIJÃO-MUNGO (*Vigna radiata* L.) COZIDO E GERMINADO**

Teresina (PI),  
2017

LAYS ARNAUD ROSAL LOPES

**EFEITO HIPOCOLESTEROLEMIZANTE E HEPATOPROTETOR DO  
FEIJÃO-MUNGO (*Vigna radiata* L.) COZIDO E GERMINADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Piauí, Nível Mestrado, como critério para obtenção do título de Mestre (a) em Alimentos e Nutrição.

**Área de concentração:** Alimentos e Nutrição

**Linha de pesquisa:** Qualidade de Alimentos

**Orientador(a):**

Prof. Dr.(a) Karoline de Macêdo Gonsalves Frota

**Co-orientador:**

Prof. Dr. Kasel Jackson Damasceno e Silva

Teresina (PI),  
2017

*Dedico essa conquista aos meus pais,  
José Luciano e Elenilda, minha irmã Luna e  
ao meu amado Onias Filho, dos quais recebi  
incentivo e apoio durante a realização deste  
trabalho.*

*“Mas os que esperam no Senhor renovarão as  
forças, subirão com asas como águias; correrão, e não  
cansarão, caminharão e não se fatigarão”*

*(Isaias, 40,31)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, dono de toda sabedoria, por tudo que tem permitido em minha vida.

Poderoso e misericordioso é o Senhor.

A minha orientadora, professora Karoline de Macêdo Gonçalves Frota, que não mediu esforços para a execução desta pesquisa. Foi dedicada em todos os aspectos, me impulsionou, forneceu conhecimento e experiência para meu amadurecimento como pesquisadora e como ser humano. Além de tudo isto, o mais importante, sempre acreditou em mim, me protegeu como filha e acolheu como amiga.

A professora Maria do Carmo Carvalho e Martins, por ter aceitado participar desta pesquisa, juntamente com seus alunos de mestrado e proporcionar a realização deste trabalho. Sou grata por ter me considerado como sua aluna e ter me recebido tão bem no departamento de fisiologia contribuindo em todas as análises deste trabalho.

Ao professor Kaesel Damasceno, por me receber na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e apoiar o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Airton, por possibilitar a utilização do Biotério de Experimentação do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Piauí e também por proporcionar a realização das análises histológicas

Ao professor Alessandro por proporcionar a realização das análises de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

Aos meus companheiros de projeto, Luciana, Ana Karoline, Vanessa, Geovane e Cristian, com os quais vivi momentos de dificuldade e também muitos de felicidade. Obrigada pela dedicação, pelo companheirismo e pela amizade.

A Irlene e ao professor Paulo Humberto no Departamento de Fisiologia e aos funcionários do departamento de Anatomia e morfologia. Sempre oferecendo ajuda quando necessário, obrigada pelo carinho e por permanecerem com um sorriso no rosto.

A Isabel e Luís Michel por me ajudarem durante as análises e procedimentos realizados na EMBRAPA.

A Clarisse e ao Guerra, por me ajudarem durante as análises histológicas.

A Ana Cibele, por ajudar na realização das análises de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

Aos alunos (as) de iniciação científica Andressa, Kelly Rafaela, Nicolas, Acássio, Jean, João Guilherme e Geraldo. Obrigada por terem reduzido tantas vezes o grande volume de trabalho. Obrigada pelas risadas e momentos de descontração e também agradeço por permitirem que eu transmitisse meu conhecimento e orientação.

Agradeço aos meus pais, minha mãe Elenilda, minha primeira professora e eterna orientadora, e ao meu pai Luciano pelos esforços para que eu conseguisse chegar até aqui, foi um longo caminho, com muitas dificuldades a serem superadas. Obrigada por terem acreditado em mim, e me apoiado, por me ajudarem a realizar um sonho.

Agradeço a minha irmã por estar sempre ao meu lado e me apoiar sempre, ao Mateus pelos sorrisos a mais nos meus dias.

A meu avô Urbano (in memoriam) e minha avó Socorro, por toda a sabedoria, ajuda, carinho e incentivo que recebi até hoje.

Ao Onias Filho, o meu amor, que entrou em minha vida para não mais sair. É quem completa, constrói e refaz a minha felicidade constantemente com zelo, cumplicidade e amor. Sua contribuição não tem medidas, durante esta pesquisa foi meu principal incentivador, foi meu financiador, foi meu ajudante durante as análises, foi meu revisor ortográfico e me obrigou a descansar quando precisava. Acima de tudo foi meu companheiro e segurou minhas mãos para que eu não caísse. Você é um presente na minha vida, muito obrigada.

## RESUMO

Lopes, L. A. R. Efeito hipocolesterolemizante e hepatoprotetor do feijão-mungo (*Vigna radiata* L.) cozido e germinado. 2017. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição. Universidade Federal do Piauí.

A dieta tem sido apontada como um dos fatores determinantes para a elevação do risco das Doenças cardiovasculares (DCV) na população brasileira. Intervenções alimentares com leguminosas têm sido destacadas por auxiliarem na prevenção de DCV devido ao seu efeito modulador do perfil lipídico. O feijão-mungo (*Vigna radiata* L.) é uma leguminosa de origem asiática cujo consumo vem se estendendo no Brasil, principalmente pelo aumento na procura pelo broto-de-feijão, o qual é obtido por germinação. Este processamento promove um incremento no teor de nutrientes e compostos bioativos do feijão-mungo. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito hipocolesterolemizante e hepatoprotetor do feijão-mungo cozido e germinado. Parte do feijão-mungo, cultivar MGS-Esmeralda foi cozida em autoclave (120°C) e outra parte germinada por 72 horas. O feijão-mungo cozido e o germinado foram secos em estufa ventilada a temperatura 50° C por 72h originando duas farinhas, Farinha de Feijão Integral (FFC) e Farinha de Feijão Germinado (FFG). Foram realizadas análises de composição química das farinhas por métodos oficiais. A partir do extrato aquoso e etanólico foram realizadas determinações de compostos fenólicos totais usando o reagente *Folin Ciocalteu* e Atividade Antioxidante Total pelos métodos de captura dos radicais DPPH• (2,2 difenil-1-picril-hidrazil) e ABTS•+ 2,2'azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid). Foi realizado um ensaio experimental em hamsters hipercolesterolemizados pela dieta contendo 20% de caseína, 13,5% de gordura de coco e 0,1% de colesterol por 21 dias. A FFC e a FFG foram utilizadas como fonte proteica na produção das dietas experimentais de intervenção por 28 dias. Um ensaio de digestibilidade verdadeira da proteína foi desenvolvido paralelamente. Foram realizadas análises de perfil lipídico (colesterol total, HDL-c, colesterol não-HDL e triglicerídeos), de função hepática (proteínas totais e albumina), de lesão hepática (Aspartato aminotransferase - AST e Alanina aminotransferase - ALT) e análises histológicas no tecido hepático. Foram realizadas comparações de médias pelos testes t de Student, Tukey e Mann-Whitney, ao nível de significância de 5 % no programa SPSS 10.0 (USA). Foi observada uma elevação do teor de proteínas (FFC=23,4% vs. FFG=26,2%) e uma melhora na digestibilidade verdadeira da proteína do feijão-mungo após germinação (FFC=82,3% vs. FFG=87,7%). Além disso, foi observado um maior teor de compostos fenólicos totais (Extrato aquoso - FFC=98,82±0,35 vs. FFG=160,45±2,68 / Extrato etanólico - FFC=18,0 vs. FFG=53,8 mg de ácido gálico.100g<sup>-1</sup>) e Atividade Antioxidante Total (AAT) pelos dois métodos estudados (Extrato aquoso - [AAT- DPPH]: FFC=111,17±4,9 vs. FFG=119,19±3,4; [AAT-ABTS]: FFC=482,93±1,44 vs. FFG=591,53±4,92 / Extrato etanólico - [AAT-DPPH]: FFC=69,70±7,44 vs. FFG=110,98±1,35; [AAT- ABTS]: FFC=115,86±1,56 vs. FFG=235,93±24,12) no feijão-mungo germinado em relação ao cozido. Foi verificada uma redução nas concentrações séricas de colesterol total e colesterol não-HDL e das enzimas AST e ALT nos animais tratados com FFC e FFG em relação aos animais hipercolesterolemizados que não receberam tratamento com feijão mungo. Além disso, foi observada uma redução na deposição de lipídeos hepáticos nos animais tratados com FFC em relação aos animais não tratados e uma redução ainda maior nos animais tratados com FFG, além disso foi verificada um menor infiltrado inflamatório e melhor vascularização do tecido hepático nos animais tratados com o feijão germinado. Portanto, conclui-se que o feijão-mungo é uma leguminosa com propriedades funcionais no que se refere ao efeito hipocolesterolemizante e hepatoprotetor, e que pode ter seu potencial funcional melhorado após a germinação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Feijão-mungo. Leguminosas. Germinação. Hipercolesterolemizante. Hepatoprotetor.

## ABSTRACT

Lopes. L. A. R. Effect hypocholesterolemic and hepatoprotective of mung bean (*Vigna radiata* L.) cooked and germinated. 2017. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição. Universidade Federal do Piauí.

The diet has been identified as one of the determinants for the elevation of the risk of cardiovascular diseases (CVD) in the Brazilian population. Feeding interventions with legumes have been highlighted as helping to prevent CVD due to its lipid profile modulating effect. Mung bean (*Vigna radiata* L.) is a legume of Asian origin whose consumption has been extended in Brazil, mainly by the increase in the demand for the bean sprout, which is obtained by germination. This processing promotes an increase in the content of nutrients and bioactive compounds of mung bean. Therefore, the objective of this work was to evaluate the hypocholesterolemic and hepatoprotective effect of cooked mung bean and sprouted mung bean. Part of the mung bean, cultivar MGS-Esmeralda was cooked in an autoclave (120 ° C) and another part germinated for 72 hours. The cooked and germinated mung bean were dried in a ventilated oven at 50° C for 72 hours giving two flours, Bean Flour (FFC) and Germinated Bean Flour (FFG). Analyzes of the chemical composition of the flour were carried out by official methods. From the aqueous and ethanolic extract total phenolic compounds were determined using Folin Ciocalteu reagent and Total Antioxidant activity by the DPPH • (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS • + 2,2'-azinobis- (3-ethylbenzthiazoline -6-sulfonic acid). An experimental study was carried out on hamsters hypercholesterolemized by diet containing 20% casein, 13.5% coconut fat and 0.1% cholesterol for 21 days. FFC and FFG were used as a protein source in the production of experimental diets for intervention for 28 days. A true digestibility assay of the protein was developed in parallel. Were realized serum lipid profile analysis (total cholesterol, HDL-c, non-HDL cholesterol and triglycerides), liver function (total proteins and albumin), liver damage (AST and Alanine aminotransferase - ALT) and histological analyzes in hepatic tissue. Student's t, Tukey and Mann-Whitney t-tests were compared at a significance level of 5% in the SPSS 10.0 (USA) software. There was an increase in protein content (FFC = 23.4% vs. FFG = 26.2%) and an improvement in the true digestibility of the mung bean protein after germination (FFC = 82.3% vs. FFG = 87, 7%). In addition, a higher content of total phenolic compounds was observed (Aqueous extract - FFC=98,82±0,35 vs. FFG=160,45±2,68 / Ethanolic extract - FFC=18,0 vs. FFG=53,8 mg of gallic acid.100g-1) and Total Antioxidant Activity (AAT) by the two methods studied (Aqueous extract - [AAT- DPPH]: FFC=111,17±4,9 vs. FFG=119,19±3,4; [AAT-ABTS]: FFC=482,93±1,44 vs. FFG=591,53±4,92 / Ethanolic extract - [AAT-DPPH]: FFC=69,70±7,44 vs. FFG=110,98±1,35; [AAT- ABTS]: FFC=115,86±1,56 vs. FFG=235,93±24,12) in the germinated mung bean relative to the cooked whole. A reduction in serum concentrations of total cholesterol and non-HDL cholesterol and AST and ALT enzymes was observed in animals fed with FFC and FFG compared to hypercholesterolemic animals that received no mung bean treatment. In addition, a reduction in hepatic lipid deposition was observed in FFC-treated animals compared to untreated animals and an even greater reduction in FFG-treated animals. Furthermore, a lower inflammatory infiltrate and a better vascularization of hepatic tissue were observed in the animals treated with the sprouted beans. Therefore, it is concluded that mung bean is a legume with functional properties regarding the hypocholesterolemic and hepatoprotective effect, and that its functional potential can be improved after germination.

**KEYWORDS:** Mung bean. Pulse. Germination. Hypercholesterolemic. Hepatoprotective.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Aspectos Gerais do Metabolismo Lipídico</b> .....	<b>17</b>
2.1.1 Lipoproteínas .....	17
2.1.2 Absorção, transporte e metabolismo de lipídeos .....	17
2.1.3 Síntese de colesterol.....	19
2.1.4 Danos hepáticos .....	21
<b>2.2. Papel da dieta no Metabolismo Lipídico</b> .....	<b>20</b>
<b>2.4 Feijão-mungo</b> .....	<b>21</b>
2.4.1 – Taxonomia, distribuição geográfica e potencial agrônômico no Brasil.....	22
2.4.2 Conteúdo nutricional.....	24
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
3.1.1 Geral .....	26
3.1.2 Específicos .....	26
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1 Matéria-prima</b> .....	<b>27</b>
3.1.1 Cocção do feijão-mungo.....	27
3.1.2 Germinação do feijão-mungo .....	27
3.1.3 Obtenção das farinhas.....	27
<b>3.2 Caracterização das farinhas</b> .....	<b>28</b>
3.2.1 Composição química.....	28
3.2.2 Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total .....	28
3.2.2.3 Atividade Antioxidante Total utilizando o radical DPPH• (2,2 difenil-1-picril-hidrazil) .....	29
3.2.2.4 Atividade Antioxidante Total utilizando o radical ABTS•+ 2,2'azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid).....	29
<b>3.3 Produção das Dietas Experimentais</b> .....	<b>30</b>
3.3.1 Dietas experimentais .....	30
3.3.1.1 Planejamento nutricional das dietas .....	30
3.3.1.2 Composição centesimal das dietas .....	32
<b>3.4 Ensaio biológico</b> .....	<b>32</b>
3.4.1 Critérios éticos .....	32
3.4.2 Animais .....	32

3.4.3 Delineamento principal .....	33
3.4.4 Determinação da digestibilidade verdadeira da proteína.....	34
3.5 Análises no plasma dos hamsters .....	36
3.5.1 Perfil lipídico .....	36
3.5.2 Função Hepática .....	36
3.5.2 Lesão hepática.....	36
3.6 Análises nas fezes dos hamsters.....	37
3.6.1 Digestibilidade verdadeira da proteína .....	37
3.7 Análise histológica .....	37
3.8 Análise estatística.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
4.1. Caracterização do feijão-mungo cru, cozido e germinado .....	40
4.2 Caracterização das dietas experimentais .....	44
4.3 Ensaio biológico .....	45
4.3.1 Ensaio - Digestibilidade Verdadeira da proteína .....	45
4.3.2 Ensaio Principal.....	47
4.3.2.3 Perfil lipídico .....	50
4.3.2.4 Marcadores de função e dano hepático .....	54
4.3.2.5 Análises histopatológicas.....	56
5. CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS .....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Necessidades nutricionais de hamsters alimentados ad libitum .....	30
<b>Tabela 2.</b> Composição planejada das dietas experimentais.....	31
<b>Tabela 3.</b> Classificação das alterações no tecido hepático .....	38
<b>Tabela 4.</b> Composição química do feijão-mungo ( <i>Vigna radiata</i> L.) cru, cozido (FFC) e germinado (FFG), em base seca. ....	40
<b>Tabela 5.</b> Compostos Fenólicos Totais (CFT) e Atividade Antioxidante Total com o radical DPPH• (AAT-DPPH) e com o radical ABTS•+ (AAT-ABTS) no feijão-mungo cozido (FFC) e no feijão-mungo germinado (FFG) em extrato aquoso e etanólico.....	42
<b>Tabela 6.</b> Composição Química das dietas hipercolesterolemizante com caseína (DHC), com feijão-mungo cozido (DFFC), com feijão-mungo germinado (DFFG), e ração apteica (RA), em base seca. ....	44
<b>Tabela 7.</b> Peso corporal, ganho de peso, consumo diário médio e Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) dos hamsters nos grupos controle negativo (GCN), controle positivo (GCP) e grupos experimentais com farinha de feijão integral (GFFC) e germinado (GFFG). ....	48
<b>Tabela 8.</b> Perfil lipídico dos animais antes e após 21 dias de hipercolesterolemia hipercolesterolemia (Tempo 0 - t0 e Tempo 1 - t1).....	50
<b>Tabela 9.</b> Perfil lipídico nos grupos controle negativo (CN), controle positivo (CP) e grupos experimentais com farinha de feijão integral (GFFC) e germinado (GFFG) no momento final do experimento (Tempo 2 – t2). ....	51
<b>Tabela 10.</b> Proteínas totais, albumina, Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT) nos grupos controle negativo (CN), controle positivo (CP) e grupos experimentais com farinha de feijão integral (GFFC) e germinado (GFFG). ....	54

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Feijão-mungo cru, B - Feijão-mungo cozido, C- Feijão-mungo germinado .....	27
<b>Figura 2.</b> A- Dieta hipercolesterolemizante com caseína, B- Dieta experimental com farinha de feijão-mungo cozido, C- Dieta experimental com farinha de feijão-mungo germinado, D- Dieta aprroteica.....	32
<b>Figura 3.</b> Fluxograma ensaio biológico principal.....	35
<b>Figura 4.</b> Digestibilidade Verdadeira (DV) da Caseína, da proteína da Farinha de Feijão-mungo Cozido (FFC) e da proteína da Farinha de Feijão-mungo Germinado (FFG). .....	45
<b>Figura 5.</b> Peso médio do Fígado (g/100g) dos grupos controle negativo (GCN), controle positivo (GCP) e grupos experimentais com farinha de feijão integral (GFFC) e germinado (GFFG). .....	49
<b>Figura 6.</b> Classificação em “+” dos achados histopatológicos nos fígados dos hamsters nos grupos controle negativo (GCN), controle positivo (GCP) e grupos experimentais com feijão integral (GFFC) e germinado (GFFG) .....	56
<b>Figura 7. 1.</b> Prancha com fotomicrografias dos cortes do fígado do Grupo Controle Negativo (GCN). .....	57
<b>Figura 7. 2.</b> Prancha com fotomicrografias dos cortes do fígado do Grupo Controle Positivo (GCP). .....	57
<b>Figura 7. 3.</b> Prancha com fotomicrografias dos cortes do fígado do Grupo Farinha de Feijão Integral (GFFC). .....	58
<b>Figura 7. 4.</b> Prancha com fotomicrografias dos cortes do fígado do Grupo Farinha de Feijão Germinado (GFFG). .....	58

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

- DCV - Doenças Cardiovasculares.
- TG - Triglicerídeos.
- VLDL - *Very Low Density Lipoprotein*.
- LDL - *Low Density Lipoprotein*.
- HDL - *High Density Lipoprotein*.
- IDL - *Intermediary Density Lipoprotein*.
- AG - Ácidos graxos.
- Apo - Apolipoproteína.
- LPL - Lipase Lipoproteca.
- LH - Lipase Hepática.
- DHGNA - Doença hepática gordurosa não alcoólica.
- AGL - Ácidos graxos livres
- CY7A1 - 7- $\alpha$ -hidroxilase.
- Acetil-coA - acetilcoenzima-A.
- HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima-A.
- FFC - Farinha de Feijão-mungo Cozido.
- FFG - Farinha de Feijão-mungo Germinado.
- DPPH - 2,2 difenil-1-picril-hidrazil
- ABTS - 2,2'azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
- DC - Dieta comercial.
- DHC - Dieta hipercolesterolemizante com caseína.
- DFFC - Dieta experimental com FFC .
- DFFG - Dieta experimental com FFG.
- CCA - Coeficiente de Eficiência Alimentar.
- GCN - Grupo Controle Negativo.
- GCP - Grupo Controle Positivo.
- GFFC - Grupo Farinha de Feijão-mungo Cozido.
- GFFG - Grupo Farinha de Feijão-mungo Germinado.
- AST - Aspartato aminotransferase.

ALT - Alanina aminotransferase.

CFT - Compostos Fenólicos Totais.

AAT - Atividade Antioxidante Total.

AAT-DPPH - Atividade Antioxidante Total utilizando o radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil.

AAT-ABTS- Atividade Antioxidante Total utilizando o radical 2,2'azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid).

VET - Valor Energético Total.

DV - Digestibilidade Verdadeira da Proteína.

CEA - Coeficiente de Eficiência Alimentar.

CT - Colesterol Total.

LDL-c - LDL colesterol.

HDL-c - HDL colesterol.

n-HDL-c - Não HDL colesterol.

SREBP-1 - Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1

FSA - Ácido graxo sintase.

ACADS - Acil-CoA-desidrogenase de cadeia curta.

ACSM - Acil-CoA-desidrogenase de cadeia média.

CPT1 - Carnitina palmiltrasnferase 1.

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) assumem posição de destaque, representando 30% do total de óbitos no Brasil (BRASIL et al., 2011). Estima-se que, no mundo, 17,5 milhões de pessoas morreram em decorrência de doenças cardiovasculares em 2012, o que corresponde a 31% de todas as mortes (WHO, 2015<sup>a</sup>).

As principais manifestações das DCV são o infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular cerebral, que ocorrem principalmente devido a obstruções em arteriais, em consequência do aumento nos níveis de colesterol sanguíneo (WHO, 2015<sup>a</sup>, WHO, 2015<sup>b</sup>). No mundo, estima-se que o colesterol elevado cause 2,6 milhões de mortes a cada ano (WHO, 2009).

A dieta tem sido apontada como um dos fatores determinantes para a elevação do risco das DCV na população brasileira, em decorrência de um menor consumo de vegetais e frutas, acompanhado de maior consumo de gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras trans, colesterol e açúcares que contribuem para o estabelecimento de excesso de peso, da obesidade e dislipidemias (BRASIL, et al., 2011).

Intervenções alimentares com leguminosas têm sido destacadas por auxiliarem na redução do risco de DCV devido ao seu efeito modulador do perfil lipídico (FROTA; MATIAS; ARÊAS, 2010; FROTA, et al., 2015). A proteína de soja, por exemplo, foi aprovada pelo *Food and Drug Administration*, como sendo alimento saudável para ser usado no controle dos níveis de colesterol total (MEJIA; LUMEN, 2006).

A modulação do perfil lipídico tem sido verificada não somente em relação à soja, mas também em outras leguminosas como o tremoço, grão de bico, lentilha e os feijões. Além disso, foram observadas reduções na deposição de lipídeos hepáticos e prevenção do estabelecimento da esteatose em leguminosas como feijão-caupi e tremoço (BARABANA, et al., 2011, FONTANARI, et al., 2012, FROTA, et al., 2008, FROTA, et al., 2015, XUE, et al., 2014).

Estudos vêm evidenciando que vários componentes presentes nas leguminosas justificam tal efeito, como compostos bioativos e as fibras alimentares, agindo por complexação e as proteínas presentes nessas leguminosas em função de sua composição de aminoácidos específicos e peptídeos bioativos. Além do papel do conteúdo de colesterol na partícula de LDL sobre a fisiopatologia das DCVs, as modificações oxidativas da LDL e a inflamação, são consideradas essenciais ao desenvolvimento das lesões ateroscleróticas. A presença nas leguminosas de compostos bioativos com elevada atividade antioxidante pode contribuir para

a modulação do estresse oxidativo e prevenção dos danos ateroscleróticos (CHAVEZ-SANTOSCOY, et al., 2014, FROTA; MATIAS; ARÊAS, 2010, MARQUES, et al., 2015; MOHAMMADIFARD et. al., 2014, PIRILIO, 2013; SIQUEIRA et al., 2006).

O feijão-mungo (*Vigna radiata* L.) é uma leguminosa produzida na China, Birmânia, Índia, Coréia, Paquistão, Japão, Tailândia e outras partes do sudeste da Ásia (ZHANG, et. al. 2013). O seu cultivo no Brasil apesar de não ser tão difundido vem se estendendo principalmente devido a um aumento na procura pelo broto-de-feijão, forma na qual é mais consumido (VIEIRA, et al., 2003). Além do mais, é de fácil adaptação aos climas tropicais e subtropicais encontrados no Brasil, possui boa produtividade quando comparado ao feijão comum, o que proporciona um incentivo a sua produção, principalmente entre os pequenos produtores (DUQUE, et al., 1987).

Destaca-se também o potencial de difusão dessa leguminosa no ocidente e em particular no Brasil, devido ao seu valor nutritivo. O feijão-mungo possui um elevado teor de proteínas, além de ser rico em diversos compostos bioativos, entre estes, peptídeos, polissacarídeos, ácidos fenólicos, flavonoides e oligossacarídeos. Além disso, a germinação, é uma forma de processamento simples e de baixo custo que pode promover um incremento no teor proteico, fibras e compostos bioativos desta leguminosa (MAMILLA; MISHRA, 2017, TANG et al., 2014<sup>a</sup>, TANG et al., 2014<sup>b</sup>, ZHANG, et. al., 2013).

Um recente estudo constatou que a proteína isolada do feijão-mungo é capaz de inibir a expressão de genes relacionados a síntese de ácidos graxos em ratos hipercolesterolemizados. Ademais, foi demonstrado que o feijão-mungo fermentado apresenta efeito hepatoprotetor e hipocolesterolemizante em camundongos hipercolesterolemizados. Apesar disso, até o momento, não existem pesquisas publicadas com intervenções realizadas com feijão-mungo germinado na dieta hipercolesterolemizante e apenas um estudo com suplementação de feijão-mungo integral, porém com baixas concentrações do feijão (TACHIBANA, et al., 2013, YAO, et al., 2014, YEAP, et al., 2015,

Portanto, este trabalho tem como objetivo investigar o efeito hipocolesterolemizante e hepatoprotetor da ingestão do feijão-mungo (*Vigna radiata* L.) integral e germinado em hamsters hipercolesterolemizados por meio da dieta.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos Gerais do Metabolismo Lipídico

#### 2.1.1 Lipoproteínas

Como a gordura não pode ser dissolvida no plasma, o transporte de lipídeos no ser humano é realizado através de partículas globulares formadas a partir da combinação de lipídios e proteínas em diversas proporções denominadas lipoproteínas. Estas são constituídas por um núcleo apolar de triglicerídeos (TG) e ésteres de colesterol, colesterol livre e apolipoproteínas que são proteínas de peso molecular variável, recebem nomenclatura alfa-numérica (apolipoproteínas AI, AII, AIV, B, CII e E) e cada uma possui uma função distinta e específica no metabolismo das lipoproteínas servindo de elementos estruturais, atuando como ligantes de receptores e exercendo o papel de cofatores regulatórios (BRUNZELL; FAILOR, 2006, MAGNONI; STEFANUTO; KOVACS, 2007).

As lipoproteínas podem ser classificadas em quatro tipos: (a) Quilomicrons, provenientes da digestão, ricos em TG maiores e menos densos. Além de TG os quilomícrons transportam colesterol exógeno, ácidos graxos e vitaminas lipossolúveis absorvidas dos alimentos digeridos, (b) “*Very Low Density Lipoprotein*” (VLDL) de origem hepática ricos em TG e de densidade muito baixa; (c) “*Low Density Lipoprotein*” (LDL) ricas em colesterol e de densidade baixa e (d) “*High Density Lipoprotein*” (HDL) de origem hepática, ricas em colesterol e de alta densidade. Existe ainda uma classe de lipoproteínas de densidade intermediária ou “*Intermediary Density Lipoprotein*” (IDL) (XAVIER, et al., 2013).

As principais Apolipoproteínas e suas funções são: (A) Apo A-I, proteína estrutural da HDL; ativa a lecitina-colesterol aciltransferase; (B) Apo A-II, proteína estrutural da HDL; (C) Apo B-48, proteína estrutural do quilomícrons; (D) Apo B-100, proteína estrutural da VLDL, IDL e LDL, ligante do receptor de LDL; (E) Apo C-II, ativador de lipase lipoproteica (LPL); (F) Apo C-III, potencial inibidor das funções da apo C-II e da apo E; (G) Apo E, ligante do receptor de remanescentes de quilomícron e do receptor de LDL; (H) Apo(a), função ainda desconhecida; antagoniza o plasminogênio (BRUNZELL; FAILOR, 2006).

#### 2.1.2 Absorção, transporte e metabolismo de lipídeos

A gordura da dieta é composta, sobretudo por triacilgliceróis (TG), sendo o restante constituído por outras formas de lipídeos, como fosfolipídeos, ácidos graxos, colesterol e fitosteróis. O processo de digestão e absorção dos lipídeos é complexo, iniciando no estômago

e passando pelo intestino delgado, no qual ocorre a parte principal da digestão e a absorção. (VAZ, et al., 2006)

Após a ingestão, as lipases pancreáticas hidrolisam os TG em Ácidos Graxos (AG) livres, monoglicerídeos e diglicerídeos. Os sais biliares liberados na luz intestinal emulsificam esses e outros lípidos oriundos da dieta e da circulação entero-hepática, com formação de micelas. A solubilização dos lípidos sob a forma de micelas facilita sua movimentação pela borda em escova das células intestinais (XAVIER, et al., 2013)

No lúmen intestinal, os AG de cadeia curta e média são absorvidos e transportados diretamente para o fígado pela corrente sanguínea, enquanto os AG de cadeia longa são ressintetizados a TG no interior dos enterócitos formando quilomícrons que atingem a circulação através do sistema linfático (SPECTOR, 1984).

O transporte dos AG é composto pelas vias metabólicas exógena e endógena. Na fase pós-absortiva (ciclo exógeno), quando os quilomícrons atingem a circulação, sofrem hidrólise de seus TG pela ação da enzima LPL e tornam-se uma partícula menor, denominada quilomícron remanescente, que são finalmente captadas pelo fígado por receptores próprios (GENEST, 2003). Os produtos da ação da LPL são AG e gliceróis que são utilizados pelos tecidos periféricos ou armazenados nos adipócitos (DANE-STEWART, et. al., 2003).

Na fase de jejum (ciclo endógeno), os AG procedentes dos adipócitos são transportados no plasma principalmente pela albumina, até os tecidos periféricos, onde são oxidados para fornecer energia. Os AG esterificados (TG, ésteres de colesterol, fosfolípidos e outros), oriundos principalmente do fígado, são transportados pelas lipoproteínas VLDL e, em menor proporção, pelas LDL (BOULLART; GRAAF; STALENHOEF, 2012, LARGE, et al., 2004).

As VLDL são formadas no fígado e liberadas para os músculos e tecido adiposo e exercem função essencial no transporte endógeno dos AG sob a forma de TG. Os TG das VLDL são hidrolisados pela LPL, gerando as IDL (VAZ, et al., 2006). Essa hidrólise libera ácidos graxos para armazenamento de gordura no tecido adiposo ou para serem oxidados na produção de energia pelos músculos e outros tecidos (KIRK, 2005).

As IDL podem ser removidas da circulação por receptores hepáticos específicos ou, após a ação da Lipase Hepática (LH), originam as LDL, menores e mais densas que as IDL. As LDL fazem parte da via metabólica das lipoproteínas ricas em colesterol, e assim como as VLDL, são responsáveis pela distribuição do colesterol para os tecidos extra-hepáticos. As HDL exercem papel fundamental no transporte reverso do colesterol, removendo o seu excesso nos tecidos periféricos (VAZ et al., 2006).

Essa captação tem início por meio das pré-HDL ou HDL nascente, ricas em fosfolípidios e em colesterol livre (KWITEROVICH, 2000; LOTEMBERG, 2009), o colesterol das células periféricas é captado pela ação da enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT). Com isso, as HDL tornam-se menos densas, maiores e mais esféricas, (LOTEMBERG, 2009; SVIRIDOV; NESTEL, 2002). O HDL é então transportado para o fígado pela corrente sanguínea, onde o excesso de colesterol captado será metabolizado e eliminado na forma de ácidos e sais biliares (VAZ, et al., 2006).

A síntese de sais biliares é regulada ao nível da atividade da 7- $\alpha$ -hidroxilase (CYP7A1) cuja síntese é estimulada quando a concentração intracelular de sais biliares baixa no fígado ou a de colesterol aumenta (WANG, 2007).

### 2.1.3 Síntese de colesterol

A maior parte do colesterol presente no organismo é proveniente da biossíntese endógena, que ocorre principalmente no fígado, sendo o restante proveniente da dieta. Entretanto o organismo tem a capacidade de sintetizar todo o colesterol necessário para as diversas funções por ele desempenhadas (WANG, 2007).

A via da biossíntese do colesterol se processa em quatro fases. Na primeira, acontece a conversão do acetilcoenzima-A (acetil-coA) em mevalonato, um composto com seis carbonos (C-6), em três passos: duas moléculas de acetil-CoA condensam, por ação da enzima tiolase (primeiro passo), formando acetoacetil-CoA, o qual condensa com uma terceira molécula de acetil-CoA (segundo passo) para formar o 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima-A (HMG-CoA), reação catalisada pela 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima-A Sintetase (HMG-CoA sintetase). O HMG-CoA é depois reduzido a mevalonato pela 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima-A Redutase (HMG-CoA redutase) (terceiro passo).

Na segunda fase, ocorre a conversão do mevalonato em unidades isoprenoides ativadas em reações de fosforilação sucessivas até a formação do farnesil-pirofosfato (15C) e finalmente forma-se o esqualeno (30C) na terceira fase. Na quarta e última fase, ocorre a ciclização do esqualeno para formar os quatro anéis do núcleo esteroide do colesterol, ao nível do retículo endoplasmático (BOTHAM; MAYES, 2006).

O passo limitante da velocidade da via do mevalonato é a conversão de HMG-CoA em mevalonato catalisada pela HMG-CoA redutase. A atividade da enzima é regulada por um mecanismo de inibição retroativa pelo mevalonato (produto imediato), e pelo colesterol (produto final), e também pela sua fosforilação, mediada pela HMG-CoA redutase (NELSON; COX, 2008). Esse ponto de controle enzimático da via possui sua importância pelo fato de que

atualmente, a forma mais utilizada para o tratamento da hipercolesterolemia é com administração fármacos inibidores desta enzima denominados de estatinas. Além disso, este parece ser um dos mecanismos pelos quais as proteínas vegetais podem inibir a síntese de colesterol (ISTVAN, 2003, MARQUES, et al., 2015).

## 2.2. Papel da dieta no Metabolismo Lipídico

Uma das principais consequências das concentrações elevadas de lipoproteínas plasmáticas é o desenvolvimento da aterosclerose. A aterosclerose é um processo inflamatório e oxidativo crônico, complexo que se inicia devido a uma desordem no metabolismo lipídico, sendo que pelo menos metade dos indivíduos que apresentam essa complicação tem como primeira manifestação um evento coronário agudo levando a morte como consequência (MENDIS, et al., 2011; XAVIER, et al., 2013).

A aterosclerose tem como processo inicial o depósito e a oxidação da LDL na parede das artérias. A oxidação da LDL confere muitas propriedades biológicas que podem fazer esta lipoproteína tornar-se aterogênica. (LIMA; COUTO, 2006), tais como o estímulo as células endoteliais a liberarem fatores quimioatraentes para monócitos (NAVAB et al., 2004), promovendo assim um acúmulo de macrófagos na íntima da parede arterial, que expressam vários receptores *scavenger*. Alguns destes receptores tem a capacidade de ligar-se e internalizar a LDL oxidada levando à formação das células espumosas, estas células podem aumentar em número gradativamente e resultam na formação da placa de ateroma, principiando a doença aterosclerótica (BARTER et al., 2004; NAVAB et al., 2004).

Nesse contexto o estresse oxidativo (EO) e a inflamação contribuem para o desencadeamento da doença aterosclerótica, sendo causado por um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres (FRANÇA et al., 2013). A importância do EO e do estado inflamatório, na aterosclerose é destacada pelo aumento de marcadores destes processos, na presença de fatores de risco para doença arterial coronariana, com valor preditivo do risco cardiovascular na prevenção primária e secundária (LEE et al., 2012).

A dieta é um importante fator de modulação das lipoproteínas plasmáticas. Os níveis séricos de colesterol e TG se elevam em função do consumo alimentar aumentado de colesterol, de carboidratos simples, de ácidos graxos saturados, de ácidos graxos trans e de excessiva quantidade de calorias (BRUNZELL; FAILOR, 2006).

A compreensão da relação entre a dislipidemia e o desenvolvimento de aterosclerose e conseqüentemente de DCV tem estimulado o desenvolvimento de estudos que

buscam terapêuticas tendo como alvo fundamental níveis ótimos de lipoproteínas plasmáticas e a redução do estresse oxidativo. O controle da dieta é considerado essencial, independente do grau de dislipidemia e manejo farmacológico empregado (XAVIER, et al., 2013).

Estudos têm demonstrado que uma dieta com baixo teor de gorduras e carboidratos e rica em frutas, legumes e cereais está associada a uma redução nos fatores de risco para DCV (NEUMANN, et al., 2007; SLEIMAN; AL-BADRI; AZAR, 2015). Essa abordagem alimentar proporciona benefícios relacionados a múltiplos fatores de risco cardiovascular (RICHTER et al., 2014). Tais efeitos estão relacionados ao fornecimento de diversos compostos cardioprotetores como ácidos graxos insaturados, proteínas, peptídeos bioativos, fibras alimentares, compostos antioxidantes e outros compostos bioativos (FROTA; MATIAS; AREAS, 2010).

O consumo de leguminosas vem sendo destacado no controle do metabolismo e desordens lipídicas, pois o seu elevado teor de fibras, baixo índice glicêmico e a presença de componentes, tais como os ácidos fenólicos, flavonoides, saponinas, fitosteróis, oligossacáridos, entre outros, são considerados os principais agentes responsáveis por esta propriedade. Além disso, alguns estudos têm mostrado a atividade biológica de proteínas de leguminosas e peptídeos oriundos da hidrólise dessas proteínas que são importantes no controle das desordens lipídicas. Os benefícios oferecidos por tais peptídeos poderiam estar relacionados com a inibição, modulação ou regulação de alguns genes de transportadores ou enzimas relacionadas à inibição da síntese endógena e absorção intestinal do colesterol (CORREA; POLTRONIERI, 2016, TACHIBANA et al., 2010, XUE et al., 2017).

Um estudo epidemiológico Iraniano que avaliou a frequência de consumo de leguminosas e a prevalência de dislipidemia em adultos (N=9660) incluindo no questionário de consumo alimentar soja, amendoim, proteína de soja, feijão, feijão de corda, fava, lentilhas, ervilha comum, grão de bico, entre outros, mostrou uma associação dose-resposta inversa entre a frequência da ingestão de leguminosas e o risco de hipertrigliceridemia, LDL-c alto e HDL-c baixo (MOHAMMADIFARD, 2014).

#### **2.1.4 Danos hepáticos**

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma condição clínica compreendida pela existência de depósitos de lipídios nos hepatócitos com percentual >5% do peso total do fígado em indivíduos sem ingestão etílica significativa e na ausência de outras etiologias de doenças hepáticas (LANKARANI, et al., 2013). A DHGNA inclui, em seu espectro, desde a esteatose simples e apenas acúmulo de gordura no fígado, até esteato- hepatite

com componente necroinflamatório, com ou sem fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (SODER; BALDISSEROTTO, 2009).

O aumento do fluxo e/ou síntese endógena de Ácidos graxos livres (AGL) pode levar ao acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos se a  $\beta$ -oxidação mitocondrial e a produção e secreção de VLDL forem insuficientes para lidar com a carga de AGL. O início da DHGNA se caracteriza pelo aumento do conteúdo intracelular de triglicerídeos devido ao desequilíbrio entre a síntese e a degradação de triglicerídeos (GAEMERS; GROEN, 2006).

Além disso, o estresse oxidativo pode contribuir negativamente para o agravamento da esteatose hepática já que provoca a ativação de citocinas inflamatórias, como TNF alfa, e gera espécies reativas de oxigênio, tais como radicais hidroxil e ânions superóxido. Tais substâncias reagem com o excesso de lípidos e forma peróxidos. Os produtos lipídicos oxidados podem lesar as células, interferindo com a função de membrana ou estimulando a fibrose pelas células hepáticas estreladas (BROWNING; HORTON, 2004)

A DHGNA está comumente associada à obesidade, ao diabetes mellitus tipo 2, à dislipidemia e à resistência à insulina. Apesar de não necessariamente estar presente na DHGNA, a obesidade, a saber, a obesidade central, é a condição metabólica mais associada à DHGNA. A esteatose hepática é frequente em indivíduos com sobrepeso ou obesidade e a probabilidade de desenvolver DHGNA aumenta com a gravidade da obesidade (BELLENTANI et al., 2000). Estima-se que a prevalência mundial da DHGNA seja de 10-24% em várias populações, podendo chegar a 50-75% em obesos e até 100% em obesos mórbidos (BENCHIMOL, 2007)

Mottin et al. (2004) realizaram um estudo em indivíduos obesos mórbidos e identificaram a presença de esteatose hepática em 94,1% da população estudada. Além disso foi observado que o índice de massa corporal (IMC) representa o único preditor independente do grau de infiltração de gordura do fígado em exames histológicos realizados em possíveis doadores de fígado vivo documentados (ANGULO et al., 1999).

## **2.4 Feijão-mungo**

### **2.4.1 – Taxonomia, distribuição geográfica e potencial agrônomo no Brasil**

*Vigna* é um gênero de feijão que compreende cerca de 160 espécies, entre elas o feijão mungo-verde (*Vigna radiata* L.) que juntamente com outras espécies como o feijão-adzuki (*V. angularis*), o feijão-arroz (*V. umbellata*) e o feijão-caupi (*V. unguiculata*) estão entre as mais importantes (STEELE; MEHRA, 1978). O feijão-mungo (*Vigna radiata* L.) não deve

ser confundido com outra espécie do gênero *Vigna* que algumas vezes é denominada popularmente: “feijão mungo preto” (*Vigna mungo*) (DAHMER; CONTERATO; SCHIFINO-WITTMANN, 2008, VIEIRA; NISHIHARA, 1992).

O feijão-mungo (*Vigna radiata* L.) é uma leguminosa tradicionalmente cultivada na Ásia, onde estima-se que esteja situada 90% de sua produção. Dentre os países asiáticos, a Índia é o maior produtor mundial, cerca de 50% do total (TICKOO; SATYANARAYANA, 1998), seguida pela Tailândia, onde a produção aumentou cerca de 22% por ano entre 1980-2000 (LAMBRIDES; GODWIN, 2006). A tendência do cultivo deste feijão no Brasil é crescente devido ao aumento da demanda pelo broto-de-feijão (VIEIRA, et al., 2003).

A planta é anual, de porte ereto ou semi-ereto, com caule, ramos e folhas cobertos por pelos, e com altura que varia de 0,3 a 1,5 m. A floração tem início entre 25 e 42 dias após a emergência, dependendo de fatores como: a cultivar, a região e da época de plantio (VIEIRA; NISHIHARA, 1992). Apresenta uma elevada produtividade, alguns cultivares produzem até 10 t de vagens verdes ou 2.000 kg de grãos/ha (JANICK; WHIPKEY, 2002), e possui características que evidenciam seu potencial uso agrônômico, destacando-se o fácil plantio, ciclo curto, estabilidade da produtividade e tolerância à seca (SANGAKKARA; SOMARATNE, 1988).

Algumas cultivares já foram introduzidas e avaliadas no Brasil. Um estudo que mostrou o comportamento de 23 linhagens e duas cultivares na região de Viçosa e Prudente Morais (MG), foi verificado um rendimento médio de 1631 kg/ha e boa adaptação ao verão, em contrapartida, um estudo mais recente realizado durante o inverno, constatou um menor rendimento de 10 genótipos de feijão-mungo em Viçosa e Coimbra no Estado de Minas Gerais (VIEIRA, et al., 2003; VIEIRA, et al., 2011).

No Brasil, o feijão-mungo é mais consumido como broto-de-feijão (LIN, 1999), mas logo após a colheita, a vagens verdes podem ser preparadas cozidas com água, refogadas, fritas ou cruas em saladas. Os grãos secos podem também ser cozidos como o feijão comum e os brotos de sementes recém-germinadas são utilizados na forma de salada (BARRADAS; SAYÃO; DUQUE 1989).

A Embrapa Meio-Norte possui um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) com acessos de *Vigna sp*, incluindo acessos de *Vigna radiata*, provenientes de introduções de diversos países, no entanto mais informações sobre estes acessos são necessárias para que os mesmos possam ser utilizados, especialmente na fase de pré-melhoramento ou em programas de melhoramento (EMBRAPA, 2008). O programa de melhoramento da Embrapa Meio-Norte conta com linhagens de feijão-mungo ainda não lançadas no mercado, em fase de pesquisa.

#### 2.4.2 Conteúdo nutricional

O feijão-mungo-verde representa uma importante fonte proteica para a população asiática oriental (LIN, 1999) e ocidental migrante (KAHLON, et al., 2005). As sementes de feijão mungo são compostas por cerca de 20% - 24% de proteínas, sendo a globulina e albumina as principais proteínas de armazenamento encontradas e constituem mais de 60% e 25% do total de proteína do feijão-mungo, respectivamente. Devido ao seu alto teor e por ser esta proteína de alta digestibilidade, o consumo do feijão-mungo em combinação com cereais pode aumentar significativamente a qualidade de proteína em uma refeição (KUDRE; BENJAKUL; KISHIMURA, 2013).

Quanto ao perfil de aminoácidos a farinha de feijão-mungo apresenta uma superioridade no conteúdo de aminoácidos sobre as farinhas de feijão comum, apresentando ainda elevados teores de aminoácidos essenciais. Em comparação com a referência da FAO/OMS (1973) a proteína de feijão-mungo é rica em aminoácidos essenciais, tais como leucina, isoleucina e valina, no entanto em comparação com o padrão de referência, a proteína de feijão-mungo é ligeiramente deficiente em treonina, aminoácidos sulfurados, e triptofano (MUBARAK, 2005).

O feijão-mungo possui maior teor de carboidratos (50% -60%) em relação a soja, o amido é o hidrato de carbono predominante e devido ao seu elevado conteúdo nas sementes o feijão-mungo têm sido utilizado para a produção de macarrão de amido, na Coreia. Oligossacáridos, incluindo rafinose, estaquiase, verbascose, estão presentes no feijão-mungo e em outras leguminosas cruas ou mal processados, geralmente estão associados à flatulência na dieta humana, no entanto, estes compostos são solúveis em água e podem ser eliminados pela adequada embebição, germinação, fermentação ou cozimento (MIFTAKHUSSOLIKHAH, et al., 2015, ZHENG, 1999).

Assim como outras leguminosas, o conteúdo de lipídeos do feijão mungo é baixo, no geral, o conteúdo de lipídios de leguminosas varia de 1,5 a 2,0 %, e pode oscilar devido a fatores diversos, tais como: genótipo, origem, localização, clima, condições ambientais e tipo de solo no qual elas crescem (ANDERSON, 1994, MACHADO, et al., 2009, GEIL;).

O feijão-mungo é rico em minerais como potássio (843 mg / 100 g), magnésio (127 mg / 100 g), cálcio (124 mg / 100 g), fósforo (326 mg / 100 g) e ferro (4,4 mg / 100 g). Rico em vitaminas como carotenos, tiamina, niacina, riboflavina e ácido ascórbico. Fornece quantidades significativas de ferro para dietas vegetarianas e em países em desenvolvimento onde é consumido. É ainda rico em vários compostos bioativos como flavonóides (flavonas,

isoflavonas e isoflavonóides), ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido cinâmico, ácido protocatecuico, ácido chiquímico, ácido p-hidroxibenzóico, etc.) e ácidos orgânicos. A vitexina e isovitexina são os principais componentes antioxidantes em feijão-mungo (KAVYA, et al., 2014; TANG, et al., 2014<sup>a</sup>)

Devido ao seu elevado conteúdo de nutrientes e substâncias biologicamente ativas, o feijão-mungo vem sendo associado a atividade antioxidante, antitumoral, antidiabética, anti-hipertensiva, anti-inflamatória e antisséptica, bem como no controle da hipercolesterolemia (TANG, et al., 2014<sup>a</sup>).

De acordo com Lorenz e D'apponia (1980), a prática de germinação de grãos de cereais e leguminosas tornou-se popular no mundo ocidental, eles podem ser usados em muitos alimentos diferentes, incluindo itens de café da manhã, saladas, sopas, caçarolas, macarrão e produtos cozidos. O feijão-mungo apresenta alta porcentagem de germinação da semente, bom vigor, e baixa porcentagem de sementes duras, o que favorece sua utilização para a produção de brotos (DUQUE et al., 1987)

O processo de germinação envolve várias atividades metabólicas na planta. Promove mudanças físico-químicas na semente decorrentes da produção de compostos mais simples a partir de proteínas e carboidratos de armazenamento para proporcionar o crescimento do embrião (MACHADO et al., 2009). Do ponto de vista nutricional, a germinação do feijão-mungo para a produção do broto-de-feijão aumenta o teor de proteínas e a sua digestibilidade, promove um incremento no conteúdo de compostos bioativos, além de reduzir fatores antinutricionais (MAMILLA; MISHRA, 2017, TANG et al., 2014<sup>b</sup>, WONGSIRI; OHSHIMA; DUANGMAL, 2015, ZHANG, et al., 2013).

Sendo assim, o feijão mungo é uma leguminosa com grande potencial agrônômico no Brasil e que é rica em nutrientes e compostos bioativos que podem desempenhar efeito funcional. Além disso, a germinação é uma forma de processamento simples e econômica que pode melhorar seu conteúdo nutricional e de compostos bioativos. Tendo em vista os poucos dados na literatura nacional e internacional sobre o efeito da ingestão do feijão mungo no perfil lipídico e efeito hepatoprotetor, objetivou-se investigar este efeito no feijão-mungo integral e germinado em hamsters hipercolesterolemizados.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1.1 Geral**

Avaliar o efeito hipocolesterolemizante e hepatoprotetor do feijão-mungo cozido e germinado.

#### **3.1.2 Específicos**

- Analisar a composição centesimal, o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante total de feijão-mungo cozido e germinado;
- Determinar a digestibilidade verdadeira das proteínas de feijão-mungo cozido e germinado;
- Verificar se a adição de feijão-mungo cozido e germinado à dieta é capaz de reduzir o colesterol plasmático, mesmo mantendo a ingestão de colesterol e ácidos graxos saturados em excesso;
- Avaliar o efeito da adição de feijão-mungo cozido e germinado em marcadores de função e lesão hepática e a deposição de lipídios hepáticos mesmo mantendo a ingestão de colesterol e ácidos graxos saturados em excesso.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Matéria-prima

O feijão-mungo, cultivar MGS-Esmeralda, foi fornecido pela Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI, Brasil (Figura 1- A).

##### 3.1.1 Cocção do feijão-mungo

Foi efetuada a sanitização das sementes de feijão-mungo por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 300 ppm por 10 minutos e lavagem com água em abundância. O cozimento dos grãos de feijão foi realizado em autoclave (Primatec, modelo CS-30) 120° C com proporção água (mL) / (g) feijão (2:1) por 15 minutos (Figura 1 - B)

##### 3.1.2 Germinação do feijão-mungo

A metodologia de germinação das sementes foi adaptada de Huang, Cai e Xu, (2014). Foi efetuada a sanitização das sementes de feijão-mungo por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 300 ppm por 10 minutos e lavagem com água em abundância. Em seguida, os grãos limpos foram embebidos por 10 horas em água potável à temperatura ambiente (30° C), após esse período, a água foi drenada e os grãos foram colocados em recipientes de polietileno esterilizados, com furos na parte inferior para drenagem da água e revestimento de algodão, a germinação ocorreu na ausência de luz por 72 horas em câmara de germinação (Marconi, modelo MA- 401), com circulação de ar, umidade relativa 100% e controlador de temperatura variando de 25°C a 35°C. Durante o período de germinação os brotos foram borrifados com água potável diariamente (Figura 1 - C).



**Figura 1.** Feijão-mungo cru, B - Feijão-mungo cozido, C- Feijão-mungo germinado

##### 3.1.3 Obtenção das farinhas

O feijão-mungo cozido e o feijão-mungo germinado foram secos em estufa ventilada a temperatura 50° C por 72h, após o período de secagem, foram moídos em moinho

analítico (IKA, modelo A11) e peneirados (35 mesh) originando duas farinhas diferentes: Farinha de Feijão-mungo Cozido (FFC) e Farinha de Feijão-mungo Germinado (FFG). As farinhas foram acondicionadas em saco de polietileno, seladas e refrigeradas até serem utilizadas na produção das dietas dos grupos experimentais.

### **3.2 Caracterização das farinhas**

#### **3.2.1 Composição química**

As análises de umidade, cinzas, lipídios e proteínas (N x 6,25) da FFC e FFG foram realizadas de acordo com metodologia oficial (AOAC, 2007), o teor de carboidratos foi calculado por diferença. O valor calórico foi estimado por meio dos fatores de conversão de ATWATER: 4 kcal.g<sup>-1</sup> para proteínas, 4 kcal.g<sup>-1</sup> para carboidratos e 9 kcal.g<sup>-1</sup> para lipídios (WATT; MERRILL, 1963).

#### **3.2.2 Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total**

##### **3.2.2.1 – Preparo dos extratos**

Para análise de Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total foram obtidos dois extratos de diferentes polaridades: extrato aquoso e etanólico (SOUSA; VIEIRA; LIMA, 2011) utilizando-se água destilada e álcool etílico absoluto (PA), respectivamente. Para extração utilizou-se 5g de amostra com adição de 50mL de cada solvente (separadamente). O conteúdo de cada extrato foi homogeneizado em turrax por 1 minuto. Em seguida as amostras foram submetidas a agitação contínua em ultrasson com banho maria por 1 hora sob a frequência 37 KHz e a temperatura 25 °C. Posteriormente o conteúdo foi filtrado à vácuo em funil de buchner, utilizando papel filtro whatmann 4°. O filtrado de cada solvente foi coletado, o seu volume foi medido utilizando proveta, em seguida foram armazenados em frascos âmbar para posterior análise.

##### **3.2.2.2 Compostos Fenólicos Totais**

A quantificação dos compostos fenólicos seguiu a metodologia descrita por Swain e Hills (1959), adaptada por (SOUSA; VIEIRA; LIMA, 2011). A partir do extrato de cada amostra, foram transferidos 0,5 mL em tubo de ensaio e adicionados 8 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente *Folin Ciocalteu*. A solução foi homogeneizada e, após 3 minutos, foi acrescentado 1 mL de solução de carbonato de sódio 20% (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Decorrida 1 hora de

repouso em temperatura ambiente e na ausência de luz, foram realizadas as leituras em triplicata das absorvâncias em espectrofotômetro a 720 nm.

Utilizou-se como padrão o ácido gálico (SIGMA), nas concentrações de 5, 10, 15, 30, 60, 120 e 180 µg/mL para construir uma curva de calibração. A partir da equação da reta obtida por regressão linear, efetuou-se o cálculo do teor de fenólicos totais, expresso em mg de ácido gálico.100 g<sup>-1</sup> de amostra.

### **3.2.2.3 Atividade Antioxidante Total utilizando o radical DPPH• (2,2 difenil-1-picril-hidrazil)**

Este método tem por base a redução do radical DPPH• que, ao fixar um H (removido do antioxidante em estudo), leva a uma diminuição da absorvância, foi descrito por Brand-Williams et al. (1995) e adaptado por Kim et al. (2002). O DPPH foi dissolvido em metanol puro para uma concentração de 0,1 mM. Essa solução foi então dissolvida em 1:100 com metanol 80%, ajustando a absorvância inicial em 515 nm para aproximadamente 0,800. A absorvância de 2,9 mL foi lida em 515 nm no tempo zero (A<sub>0</sub>) em seguida adicionada uma alíquota de 100 µL do extrato. A mistura foi incubada em temperatura ambiente ao abrigo de luz por 30 minutos, seguida de nova medida da absorvância em 515 nm (A<sub>30</sub>). A queda na leitura da densidade ótica das amostras foi correlacionada com o controle (C) (etanol ou água + radical DPPH•), estabelecendo-se a porcentagem de descoloração do radical. O poder de sequestro dos radicais foi calculado pela fórmula % = [1-(A<sub>30</sub>-C/A<sub>0</sub>)]x 100 e o resultado foi correlacionado com uma curva padrão preparada com o antioxidante sintético Trolox para construir uma curva de calibração. A partir da equação da reta obtida por regressão linear, efetuou-se o cálculo para verificar a atividade antioxidante.

### **3.2.2.4 Atividade Antioxidante Total utilizando o radical ABTS•+ 2,2'azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)**

Utilizou-se o método de captura do radical ABTS•<sup>+</sup> descrito por Re et al. (1999) e adaptado por Sousa, Vieira e Lima (2011). Inicialmente formou-se o radical ABTS•<sup>+</sup>, a partir da reação de 7 mmol de ABTS com 2,45 mmol de persulfato de potássio, os quais foram incubados à temperatura ambiente, na ausência de luz, por 14 horas. Transcorrido esse tempo, a solução foi diluída em etanol até obter-se uma solução com absorvância de aproximadamente 0,700 a 734 nm. Foram adicionados 40 µL dos extratos, diluídos em etanol, a 1960 µL do radical, determinando-se a absorvância em espectrofotômetro a 734 nm, após 10 minutos do

início da reação. A queda na leitura da densidade ótica das amostras foi correlacionada com o controle (etanol ou água + radical ABTS<sup>•+</sup>), estabelecendo-se a porcentagem de descoloração do radical ABTS<sup>•+</sup>. Utilizou-se como padrão o antioxidante sintético Trolox para construir uma curva de calibração. A partir da equação da reta obtida por regressão linear, efetuou-se o cálculo para verificar a atividade antioxidante.

### 3.3 Produção das Dietas Experimentais

#### 3.3.1 Dietas experimentais

As dietas utilizadas no experimento foram:

- Dieta comercial (Labina – Purina) (DC – controle negativo)
- Dieta hipercolesterolemizante com caseína (DHC – controle positivo): cuja única fonte de nitrogênio foi a caseína a 20 % do peso da dieta, adicionada de 0,1 % de colesterol e 13,5 % de gordura saturada na forma de gordura de coco.
- Dieta experimental com FFC (DFFC): cuja única fonte de nitrogênio foi a proteína total da FFC, com teor de 20 % do peso da dieta, adicionada de 0,1 % de colesterol e 13,5 % de gordura saturada na forma de gordura de coco
- Dieta experimental com FFG (DFFG): cuja única fonte de nitrogênio foi a proteína total da FFG, com teor de 20 % do peso da dieta, adicionada de 0,1 % de colesterol e 13,5 % de gordura saturada na forma de gordura de coco.
- Dieta aprroteica (DA): dieta isenta de fonte de nitrogênio

##### 3.3.1.1 Planejamento nutricional das dietas

O Planejamento das formulações das dietas experimentais teve como base a composição da dieta para animais em fase de crescimento proposta pelo AIN-93 (*American Institute of Nutrition*, 1993) com mistura de minerais e vitaminas adequadas ao crescimento de hamsters (REEVES, et al., 1993). Além disso, as recomendações nutricionais para hamsters em fase de crescimento (animal com 35 a 130g), segundo o *National Research Council* (1995) (Tabela 1) foram atendidas.

**Tabela 1.** Necessidades nutricionais de hamsters alimentados ad libitum

Componentes da dieta/energia	% / Kg de Ração
Fibra alimentar	5 a 15
Carboidratos	65
Lípidios	4 a 20
Proteínas	18 a 24

Fonte: *National Research Council* (1995)

A gordura de coco e o colesterol foram utilizados como indutores da hipercolesterolemia com base em outros trabalhos que desenvolveram estudos com hamsters em modelos de hipercolesterolemia (FONTANARI, et al., 2012, FROTA, et al., 2008; MENDONÇA et al., 2009).

Os cálculos para os diferentes componentes das dietas experimentais contendo feijão-mungo integral ou germinado foram baseados nas análises de composição centesimal dos feijões integral e germinado de forma que as formulações da dieta hipercolesterolemizante e dietas experimentais com FFC e FFG fossem isocalóricas, isoprotéicas e isolipídicas, e de modo a fornecerem as mesmas quantidades de colesterol e cloreto de colina.

As dietas foram suplementadas com L-metionina por ser o aminoácido limitante em dietas com proteína de leguminosas (FAO/WHO 1991). A dieta aprroteica foi formulada de modo a conter todos os nutrientes exceto proteína.

A Tabela 2 mostra a formulação planejada e composição nutricional planejada das dietas utilizadas no experimento:

**Tabela 2.** Composição planejada das dietas experimentais.

<b>Ingredientes g/kg</b>	<b>DHC</b>	<b>DFFC</b>	<b>DFFG</b>	<b>DA</b>
Caseína	221	-	-	-
Feijão-mundo integral		855		-
Feijão-mungo germinado			769	-
L-metionina		3	3	-
Sacarose	50	50	50	50
Amido de milho	427,5	-	-	548,4
Celulose Microcristalina	100	60	-	100
Oleo de soja	20	8	14	20
Gordura de coco	130	130	130	130
Colesterol	1	1	1	1
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Mix mineral AIN 93	35	35	35	35
Mix vit AIN 93	10	10	10	10
BHT	0,024	0,024	0,024	0,024
<b>Composição química</b>				
Proteína	200	200	200	200
Gordura	150	150	150	150
Ácido graxo saturado (g/100g)	70	70	70	70
Ácido graxo monoinsaturado (g/100g)	20	20	20	20
Ácido graxo polinsaturado (g/100g)	10	10	10	10

- Legenda: Dieta comercial (DC); Dieta Hipercolesterolemizante com Caseína (DHC); Dieta com Farinha de Feijão Cozido (DFFC) Dieta com Farinha de Feijão Germinado (DFFG); Dieta Aprroteica (DA).

Todas as dietas experimentais (Figura 2 - A, B, C e D). Foram produzidas na forma de pó pela empresa PRAG SOLUÇÕES Biociências © com exceção da dieta comercial. As dietas foram hidratadas e moldadas em forma de peletes em seguida seca em estufa 50°C.



**Figura 2.** A- Dieta hipercolesterolemizante com caseína, B- Dieta experimental com farinha de feijão-mungo cozido, C- Dieta experimental com farinha de feijão-mungo germinado, D- Dieta apteica.

### 3.3.1.2 Composição centesimal das dietas

As análises de umidade, cinzas, lipídios e proteínas da DHC, DFFC, DFFG, DC e DA foram realizadas de acordo com metodologia da AOAC (2007). O teor de carboidratos foi calculado por diferença.

## 3.4 Ensaio biológico

O protocolo experimental foi conduzido no Biotério de Experimentação do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Piauí.

### 3.4.1 Critérios éticos

Todos os procedimentos relacionados ao uso de animais foram realizados segundo as normas preconizadas no “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” (National Research Council, 2010), pelos princípios éticos estabelecidos pela Experimentação Animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e pela legislação nacional para vivisseção animal em vigor - Lei 11.794, de 08.10.2008 e Lei 9.605, de 12.02.98 (BRASIL, 2008; BRASIL, 1998). A pesquisa foi submetida à avaliação no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí e aprovada sob CIAEP N° 01.0264.2014.

### 3.4.2 Animais

Foram utilizados para o estudo um total de 43 hamsters (*Mesocricetus auratus*), machos, recém desmamados com padrão sanitário convencional, provenientes do biotério da

empresa ANILAB - Animais de Laboratório, Criação e Comércio LTDA - EPP registrada no CONCEA sob o CIAEP N° 01.0264.2014. Do total de animais do experimento, 37 foram destinados ao ensaio principal e 6 animais para o ensaio de digestibilidade verdadeira da proteína.

Os animais foram dispostos em gaiolas individuais, em local arejado, com temperatura em torno de 20 a 25 °C, umidade relativa de 55 %, sendo expostos ao ciclo claro-escuro de 12 horas. Os mesmos foram alimentados *ad libitum* e pesados duas vezes por semana para avaliar o ganho de peso. As dietas foram pesadas e trocadas diariamente para verificar a quantidade ingerida por cada animal, desprezando-se qualquer remanescente da dieta. A partir da razão entre o ganho de peso e quantidade da dieta consumida durante os 28 dias com dietas experimentais, foram obtidos os Coeficientes de Eficiência Alimentar (CEA) para as dietas.

Foi realizada coleta de sangue por meio da veia cava. Para realização dos procedimentos de coleta de material biológico, os animais foram submetidos a anestesia geral por aplicação inicial de lidocaína (10 mg/mL) e posteriormente de tiopental sódico na dose de 100 mg/kg de peso corporal por via intraperitoneal. Após os procedimentos de coleta, o sacrifício foi realizado por exsanguinação e o fígado foi coletado. Para coleta de fezes, no período necessário, os animais foram dispostos em gaiolas metabólicas adaptadas.

### 3.4.3 Delineamento principal

O experimento principal (Figura 3), foi realizado com 37 hamsters. Os animais passaram por um período de 20 dias de adaptação recebendo Dieta Comercial (DC) visando a diminuição do estresse ocasionado pelo traslado dos animais. Após esse período, 2 animais foram sorteados e deixados em jejum de 10 a 12 horas para coleta de sangue e análise do perfil lipídico inicial dos animais (Tempo 0 -  $t_0$ ). Após a coleta de sangue, os animais foram sacrificados e o sangue acondicionado em tubos contendo anticoagulante heparina (Liquemine) com concentração final de aproximadamente 1mg/mL para posterior análise.

Após adaptação, 8 animais foram separados aleatoriamente e continuaram recebendo DC formando um grupo denominado Grupo Controle Negativo (GCN). Os demais animais passaram a receber a Dieta Hipercolesterolemizante com Caseína (DHC), durante 21 dias. Ao final deste período, 3 animais foram sorteados e realizado uma nova coleta de sangue e sacrifício dos animais (Tempo 1 -  $t_1$ ). As duas primeiras coletas de sangue tiveram como objetivo avaliar os níveis lipídicos dos hamsters antes e após indução de hipercolesterolemia.

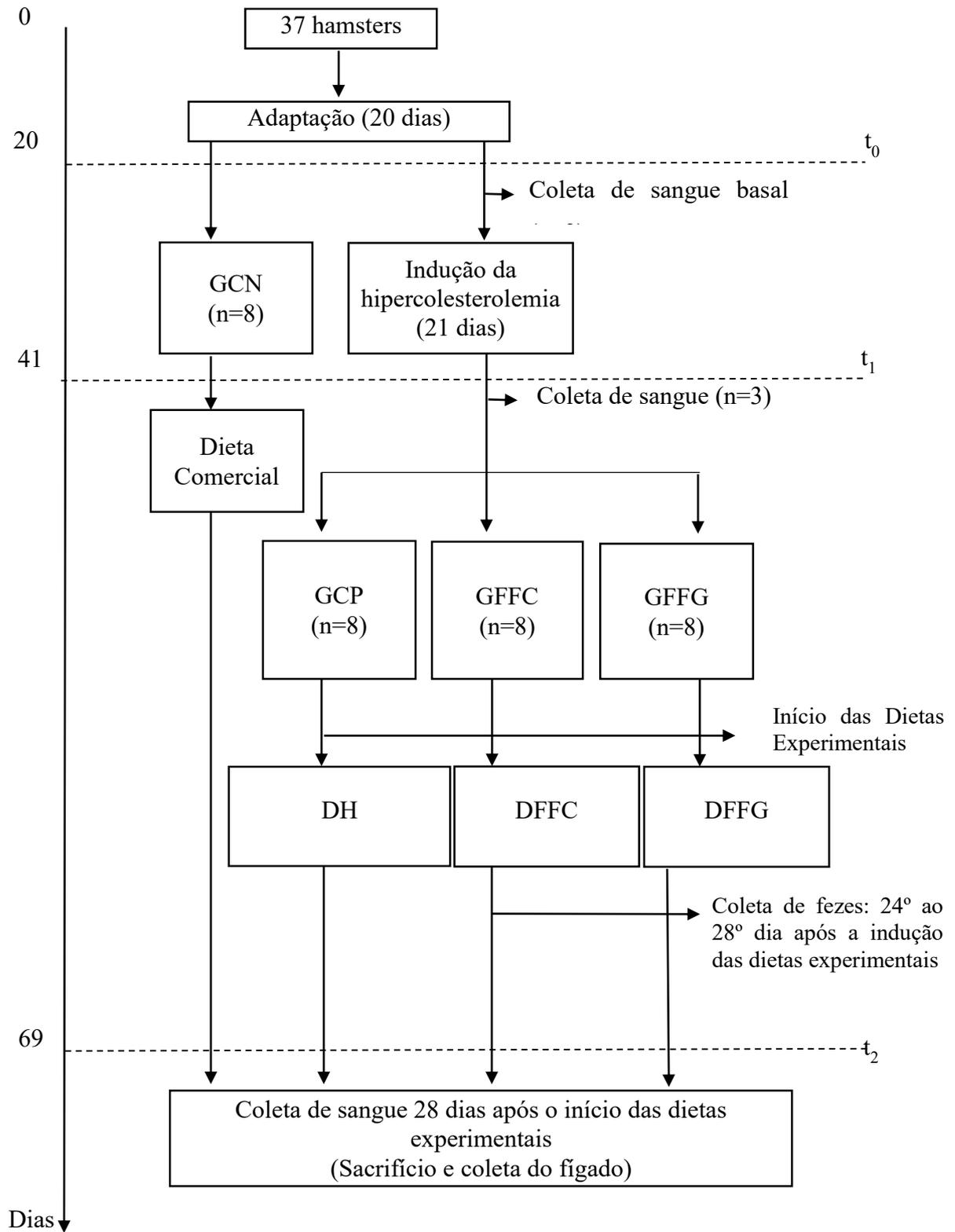
A partir de então os hamsters foram divididos aleatoriamente em mais 3 grupos de 8 animais cada, levando-se em consideração o peso dos animais. Cada grupo recebeu uma dieta

diferente por um período de 28 dias. Um dos grupos continuou com a DHC e foi denominado Grupo Controle Positivo (GCP). Outro grupo passou a receber a Dieta experimental com FFC (DFFC) e foi denominado Grupo Farinha de Feijão-mungo Cozido (GFFC). Outro grupo passou a receber Dieta experimental com FFG (DFFG) e foi denominado Grupo Farinha de Feijão-mungo Germinado (GFFG).

Nos últimos cinco dias de experimento (24<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup>) os animais foram colocados em gaiolas metabólicas adaptadas para a coleta de fezes, as mesmas foram coletadas com auxílio de pinça e armazenadas em freezer para análises posteriores. No final do período de 28 dias de experimento e depois de um jejum de 10 a 12 horas os animais tiveram o sangue coletado e acondicionado em tubos com anticoagulante heparina (Liquemine, 1mg/mL), para obtenção do plasma e hemácias para análises (Tempo 2 - t<sub>2</sub>). O fígado dos animais foi removido pesado em seguida e preservados em formol tamponado 10 % por 48h para análise histológica.

#### **3.4.4 Determinação da digestibilidade verdadeira da proteína**

Para a determinação da digestibilidade verdadeira da proteína do feijão-mungo cozido e do feijão-mungo germinado, foi formado outro grupo de 6 hamsters. Após um período de 7 dias de adaptação os animais passaram a ser alimentados com dieta isenta de proteínas (dieta aprroteica) durante 10 dias. Nos 5 últimos dias os animais foram dispostos em gaiolas metabólicas adaptadas para coleta de fezes e as mesmas foram coletadas com auxílio de pinça e armazenadas sob refrigeração (-20 °C) para posterior análise.



**Figura 3.** Fluxograma ensaio biológico principal

Legenda: GCN – Grupo Controle Negativo, GCP – Grupo Controle Positivo, GFFC – Grupo Farinha de Feijão-mungo Cozido, GFFG – Grupo Farinha de Feijão-mungo Germinado, DH – Dieta Hipercolesterolêmica, DFFC – Dieta Farinha de Feijão-mungo Cozido, DFFG – Dieta Farinha de Feijão-mungo Germinado

### **3.5 Análises no plasma dos hamsters**

Após as coletas de sangue, em um período de no mínimo 1 hora e no máximo 2 horas o mesmo foi submetido a centrifugação a baixa velocidade (10.000 rpm, 15 min, 4°C) para obtenção do plasma (WRIGHT; SALTER, 1998).

#### **3.5.1 Perfil lipídico**

Os testes para determinação do perfil lipídico no plasma seguiram o padrão analítico recomendado pelo *National Cholesterol Education Program* (WARNICK, et al., 1995). Para as análises foram utilizados kits da marca Labtest (Minas Gerais, Brasil) em analisador automático.

O teor de triglicerídeos no plasma foi determinado através do kit enzimático Cat. 87, contendo as enzimas lipase da lipoproteína, glicerolquinase e glicerol-3- fosfato peroxidase (SOLONI, et al., 1971).

O colesterol total foi determinado através do kit Cat. 76, baseado no método enzimático-colorimétrico (CHOD/PAP) com colesterol esterase, colesterol oxidase e 4-aminoantipirina.

O colesterol presente na lipoproteína de alta densidade (HDL) foi quantificado após precipitação das lipoproteínas (kit Cat. 13) que contêm apolipoproteína B (VLDL e LDL), seguida da quantificação do colesterol presente no sobrenadante (kit Cat. 76). O agente precipitante é o ácido fosfotúngstico/cloreto de magnésio (PTA/MgC) (ABELL, et al., 1952). O colesterol não HDL (LDL-c + VLDL-c) foi calculado pela subtração do colesterol total pelo HDL colesterol.

#### **3.5.2 Função Hepática**

Para determinação da função de síntese hepática, os níveis séricos de proteínas totais e albumina foram obtidos através de método colorimétrico enzimático utilizando kits comerciais da marca Labtest (Minas Gerais, Brasil), em analisador automático.

#### **3.5.2 Lesão hepática**

Para determinação de lesão hepática nos animais, os níveis séricos de Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT), foram obtidos através de método colorimétrico enzimático utilizando kits comerciais da marca Labtest em analisador automático.

### 3.6 Análises nas fezes dos hamsters

As fezes dos hamsters, mantidos em gaiolas adaptadas para coleta do material foram coletadas individualmente e armazenadas sob refrigeração (-20 °C). Após o fim do período de coleta, as mesmas foram pesadas e secas em estufa a 50 °C por 36h, em seguida pesadas novamente, trituradas e acondicionadas em frascos de polietileno e novamente refrigeradas para posterior análises.

#### 3.6.1 Digestibilidade verdadeira da proteína

O teor de nitrogênio das fezes foi analisado pelo método de micro-Kjeldhal para o cálculo de Digestibilidade Verdadeira (DV) da proteína das dietas experimentais. A DV foi então calculada subtraindo-se, da quantidade de nitrogênio ingerido nas dietas experimentais, a quantidade excretada nas fezes dos animais GFFC e GFFG menos a perda metabólica no material fecal. Esta última foi estimada pelo montante de nitrogênio excretado pelos hamsters alimentados com a dieta aprotéica (FAO/WHO, 1991).

Para cálculo da digestibilidade verdadeira da proteína foi utilizada a fórmula:

$$DV\% = \frac{I - (F - F_k)}{I} \times 100$$

Onde:

*DV*: digestibilidade verdadeira

*I*: g de nitrogênio ingerido

*F*: g de nitrogênio excretado nas fezes do animal com dieta experimental

*F<sub>k</sub>*: g de nitrogênio excretado nas fezes do animal com dieta aprotéica

### 3.7 Análise histopatológica

Após sacrifício, o fígado dos animais foi removido e preservado em formol tamponado 10 % por pelo menos 48 horas. Em seguida foram feitas secções transversais no fígado e cada animal foram escolhidos três cortes. Estes cortes foram submetidos às técnicas histológicas habituais com desidratação, inclusão em parafina para obtenção de cortes de 5 µm de espessura que em seguida foram corados com hematoxilina-eosina pela equipe do Laboratório de Histologia da UFPI.

As lâminas com cortes histológicos dos órgãos foram analisadas em microscópio de luz (Olympus) e fotomicrografadas em sistema fotomicrográfico digital (Nikon Eclipse E200,

Japan). A análise dos cortes histológicos foi realizada por meio de software de análise de imagem (Belmicroimageanalyzer).

A avaliação histológica do fígado incluiu a análise semiquantitativa dos achados histopatológicos. Para esta análise todas as lâminas foram codificadas e analisadas por um patologista sem conhecimento prévio dos tratamentos aos quais os animais haviam sido submetidos. As alterações verificadas no tecido hepático foram graduadas em uma escala de 1+ até 4+, cuja classificação está demonstrada na Tabela 3.

**Tabela 3.** Classificação das alterações no tecido hepático

Número de +		Descrição dos achados
+	Sem alterações	Tecido hepático normal, hígido
++	Alterações leves	Tecido hepático com leve aumento da relação núcleo/citoplasma dos hepatócitos e discreta congestão capilar
+++	Alterações moderadas	Tecido hepático com aumento moderado da relação núcleo/citoplasma dos hepatócitos, congestão vascular leve, aumento da celularidade e presença de infiltrado inflamatório leve.
++++	Alterações graves	Tecido hepático com perda de delimitação celular dos hepatócitos, degeneração vacuolar com grande aumento da celularidade, infiltrado inflamatório grave, grande quantidade de macrófagos e células de Kupffer nas áreas de congestão e necrose.

### 3.8 Análise estatística

Os resultados de composição química, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante total e digestibilidade verdadeira da proteína foram expressos em médias e desvio-padrão. Enquanto os resultados de ganho de peso, consumo, peso do fígado, parâmetros lipídicos plasmáticos, análises de função hepática e lesão hepática foram expressos na forma de médias e erros-padrão. Para comparação de médias, foi aplicado primeiramente o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade dos dados. Quando os dados apresentaram distribuição normal utilizou-se o teste t-Student para comparação de duas médias e análise de variância (ANOVA) para comparação de três ou mais médias, quando houve diferença significativa, foi aplicado o teste de comparação múltipla de Tukey HSD, ao nível de significância de 5 %. Para os dados com distribuição não normal, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis, quando houve diferença estatística utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-

Whitney, ao nível de significância de 5 %. O programa estatístico utilizado foi o SPSS 10.0 (USA). A construção dos gráficos foi realizada no programa SPSS 10.0 (USA).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização do feijão-mungo cru, cozido e germinado

Os resultados de composição química do feijão-mungo cru, do feijão-mungo cozido (FFC) e do feijão-mungo germinado (FFG) encontram-se na Tabela 4.

**Tabela 4.** Composição química do feijão-mungo (*Vigna radiata L.*) cru, cozido (FFC) e germinado (FFG), em base seca.

Componente (%)	Feijão-mungo cru	FFC	FFG
Umidade	11,39±0,01 <sup>c</sup>	7,44±0,62 <sup>b</sup>	6,95±0,27 <sup>a</sup>
Cinzas	3,75±0,02 <sup>b</sup>	3,43±0,02 <sup>a</sup>	4,14±0,08 <sup>c</sup>
Lipídeos	1,08±0,05 <sup>b</sup>	1,25±0,03 <sup>c</sup>	0,63±0,02 <sup>a</sup>
Proteínas	21,90±0,23 <sup>a</sup>	23,40±0,19 <sup>b</sup>	26,18±0,36 <sup>c</sup>
Carboidratos*	73,42±0,025 <sup>c</sup>	71,94±0,18 <sup>b</sup>	69,03±0,27 <sup>a</sup>
VET (Kcal.100g <sup>-1</sup> )	391,08	392,3	386,61

- VET: Valor Energético Total. - Média ± desvio padrão.- \*Carboidratos calculados por diferença, inclui fibras.

- Médias seguidas de mesma letra nas linhas, dentro de cada componente químico, são iguais estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Duangmal et al. (2015) identificaram 9,3% de umidade no feijão-mungo cru, valor próximo ao observado neste estudo. Tanto a FFC quanto a FFG apresentaram um baixo teor de umidade, resultado que já era esperado considerando que ambas passaram por processo de secagem em estufa.

O cozimento dos grãos para a produção da FFC pode ter proporcionado uma perda de minerais para a água de cocção, o que justifica a redução significativa no teor de cinzas na FFC em relação ao grão cru (EL-JASSER, 2010). De maneira similar, Pinheiro et al. (2013) observou um teor de cinzas de 3,56% no feijão-caupi cru e uma redução significativa após o cozimento, com 1,31% de cinzas.

O elevado teor de cinzas na FFG pode ter sido ocasionado pela incorporação, durante o período germinativo, de minerais presentes na água de embebição e borrifação, já que a mesma era potável. Machado et al. (2009) também observaram um aumento do teor de cinzas após a germinação em feijão-mungo.

Mubarak (2005) observou uma redução significativa no teor de lipídeos e carboidratos após a germinação de forma semelhante a este estudo. Foi observado por este autor 1,85% de lipídeos no grão cru e de 1,45% no grão germinado e teores de 62,4% de carboidratos no grão cru e 61,7% no grão germinado. A redução nos teores de lipídeos e carboidratos após a germinação promoveu uma redução no Valor Energético Total do grão germinado em relação ao grão cru e à FFC.

O decréscimo nos teores de lipídeos e carboidratos na FFG já era esperado levando-se em consideração que a germinação é um processo metabólico intenso que transforma substâncias de reserva das sementes em compostos mais simples, prontamente utilizáveis pela planta, como aminoácidos, açúcares, enzimas e vitaminas (MACHADO, et al. 2009). Os níveis mais elevados no conteúdo de lipídeos na FFC em relação ao grão cru podem ser atribuídos a uma possível ocorrência de dissociação de complexos lipídicos após a cocção (AKPAPUNAM; ACHINEWHU, 1985).

O teor de proteínas na FFG foi significativamente mais elevado em relação ao grão cru e a FFC. A elevação do teor de proteínas totais após a germinação de feijão-mungo foi observada por outros autores. Machado et al. (2009) observaram 29,2% no grão cru e 35,6% no germinado, enquanto Mubarak (2005) encontrou 26,6% no grão cozido em autoclave e 30% no germinado.

Wongsiri, Ohshima e Duangmal (2015) observaram 25,6% de proteínas no feijão-mungo cru e 28,0% no germinado. Estes autores verificaram um incremento nas quantidades da maioria dos aminoácidos essenciais de forma progressiva com o tempo de germinação, exceto lisina, metionina e cisteína, que não apresentaram diferenças significativas. Nesse estudo, a fenilalanina foi o aminoácido essencial com maior incremento durante a germinação.

As leguminosas são uma importante fonte de proteínas para a população principalmente nos países onde a ingestão de proteína animal é limitada por escassez na oferta ou por hábitos religiosos ou culturais (LIENER, 1962). Neste sentido, a germinação é uma alternativa interessante para a melhoria do conteúdo deste nutriente no feijão-mungo. Farinhas de leguminosas têm sido empregadas para melhorar o conteúdo nutricional, principalmente em relação a proteínas de diversos alimentos (BOYE, et al., 2010).

Os teores de Compostos Fenólicos Totais (CFT) e Atividade Antioxidante Total (AAT) utilizando o radical DPPH<sup>•</sup> e o radical ABTS<sup>•+</sup> em extrato aquoso e etanólico estão apresentados na Tabela 5.

A opção pela extração em diferentes polaridades é interessante tendo em vista que os Compostos Fenólicos (CF) e outros compostos bioativos que desempenham atividade antioxidante apresentam estruturas químicas variadas, assim como existem variações de sensibilidade dos compostos às condições de extração (ANTOLOVICH, et al. 2000).

**Tabela 5.** Compostos Fenólicos Totais (CFT) e Atividade Antioxidante Total com o radical DPPH• (AAT-DPPH) e com o radical ABTS•+ (AAT-ABTS) no feijão-mungo cozido (FFC) e no feijão-mungo germinado (FFG) em extrato aquoso e etanólico.

	Extrato	FFC	FFG
CFT (mg de ácido gálico.100g <sup>-1</sup> )		98,82±0,35 <sup>a</sup>	160,45±2,68 <sup>b</sup>
AAT- DPPH (µg de trolox.100g <sup>-1</sup> )	Aquoso	111,17±4,9 <sup>a</sup>	119,19±3,4 <sup>a</sup>
AAT- ABTS (µmol de trolox.100g <sup>-1</sup> )		482,93±1,44 <sup>a</sup>	591,53±4,92 <sup>b</sup>
CFT (mg de ácido gálico.100g <sup>-1</sup> )		17,99±1,11 <sup>a</sup>	53,84±1,31 <sup>b</sup>
AAT- DPPH (µmol de trolox.100g <sup>-1</sup> )	Etanólico	69,70±7,44 <sup>a</sup>	110,98±1,35 <sup>b</sup>
AAT- ABTS (µmol de trolox.100g <sup>-1</sup> )		115,86±1,56 <sup>a</sup>	235,93±24,12 <sup>b</sup>

- Média ± desvio padrão. - Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas linhas são iguais estatisticamente, pelo teste de t de Student, a 5% de significância.

Foram observadas maiores concentrações de CFT no extrato aquoso, tanto na FFC quanto na FFG. Rockenbach et al (2008), do mesmo modo, identificaram uma maior extração de compostos fenólicos utilizando água como solvente em relação ao etanol puro. O teor de CFT no feijão-mungo pode variar bastante dependendo da cultivar avaliada. Zhang et al. (2013) encontraram (usando extrato de metanol+acetona+água/ 7:7:6) entre 90 e 507 mg de ácido gálico.100g<sup>-1</sup> em grãos de feijão-mungo em diferentes cultivares avaliados.

O teor de CFT foi significativamente superior na FFG, tanto em extrato aquoso quanto em extrato etanólico. A elevação do conteúdo de CFT após a germinação verificada neste estudo também foi observada por outros autores, entretanto com variações em relação ao tempo e à temperatura de germinação. Mamilla e Mishra (2017) observaram em seu estudo utilizando extrato etanólico, 90 mg de ácido gálico.100g<sup>-1</sup> no feijão-mungo cru e após a germinação entre 150 e 250 mg de ácido gálico.100g<sup>-1</sup> a depender da temperatura empregada durante a germinação, 30 ou 40°C, respectivamente.

Huang et al. (2014) utilizando extrato acetônico observaram no feijão-mungo cru, 100 mg de ácido gálico.100g<sup>-1</sup> e após a germinação valores entre 410 e 1200 mg de ácido gálico.100g<sup>-1</sup> a depender do tempo de germinação de 24h até 120h, sendo o maior valor observado em 24h de germinação.

Wongsiri, Ohshima e Duangmal (2015) relataram em extrato etanólico, um teor de 281 mg ácido gálico.100g<sup>-1</sup> no grão cru e 978 mg de ácido gálico.100g<sup>-1</sup> após 24h de germinação. Xue et al. (2016) observou em extrato acetônico um aumento no teor de CFT após

a germinação, entretanto o maior valor foi observado no quinto dia de germinação, atingindo um teor máximo de 579 mg de ácido gálico.100g<sup>-1</sup> quase 1,20 vezes o valor das sementes.

Tang et al. (2014<sup>b</sup>) verificaram em feijão-mungo, uma redução no teor vitexina e isovitexina após a germinação, acompanhada de um aumento significativo de Kaempferol, isoquercitrina e rutina. Além disso, ácidos fenólicos como o ácido xiquímico e o ácido caféico, que não foram identificados nos grãos, foram detectados após a germinação.

O processo de cozimento para a produção da FFC pode ter provocado uma redução no teor de CFT, isso porque os compostos bioativos são degradados quando submetidos ao processamento térmico (RAWSON, et al. 2011).

Em extrato aquoso, a AAT da FFG foi significativamente mais elevada em relação a FFC pelo método utilizando o radical ABTS<sup>•+</sup> (AAT-ABTS), no entanto, não foi verificada diferença significativa empregando o radical DPPH<sup>•</sup> (AAT-DPPH). Em extrato etanólico, a FFG apresentou uma AAT significativamente mais elevada que a FFC em ambos os métodos. A elevação na AAT após a germinação de feijão-mungo foi observada por outros autores, empregando diferentes solventes na extração.

Mamilla e Mishra (2017), utilizando uma mistura de água e etanol (1:8/v:v) como solvente, observou uma elevação na AAT-DPPH de feijão-mungo após a germinação. A quantificação realizada neste estudo, empregando esses mesmos solventes isoladamente permite uma visão mais abrangente sobre a natureza dos compostos antioxidantes extraídos. Vayupharp e Laksanalamai (2013) utilizando ácido clorídrico e Wongsiri, Ohshima e Duangmal (2015) utilizando etanol como solvente, verificaram uma elevação progressiva com tempo de germinação na AAT-DPPH de feijão-mungo.

A utilização de dois diferentes métodos de quantificação da AAT possibilita a obtenção de informações complementares acerca da AAT de um alimento. O radical ABTS<sup>•+</sup> apresenta a vantagem de medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica já o DPPH<sup>•</sup> é um radical estável e com baixa taxa de deterioração e reatividade com a maioria dos compostos, assim sendo, apenas reagentes redutores mais fortes são capazes de reagir com estes radicais estáveis em um modo estequiométrico (KUSKOSKI et al, 2005, SANTOS et al, 2007).

Neste estudo, foi verificada uma maior AAT pelo método utilizando o radical ABTS<sup>•+</sup>, de modo semelhante, Pajak et al. (2014), empregando metanol como solvente na extração, identificou uma maior AAT-ABTS em feijão-mungo em comparação a AAT-DPPH. Xue et. al. (2016) observou em extrato acetônico, um aumento crescente, de acordo com o tempo de germinação tanto na AAT-ABTS quanto na AAT-DPPH, entretanto, ao contrário deste estudo, maiores valores foram verificados empregando o radical DPPH<sup>•</sup>.

A ação antioxidante “*in vivo*” dos compostos bioativos nos alimentos depende de algumas condições, como a complexidade da matriz alimentícia, absorção e biodisponibilidade em condições fisiológicas, concentração plasmática ideal para desempenhar sua atividade antioxidante; compartimento celular de atuação, entre outros (BARBOSA, et al. 2010, OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

#### 4.2 Caracterização das dietas experimentais

A partir dos dados de composição centesimal da FFC e da FFG (Tabela 4) foram definidas as formulações das dietas experimentais (Tabela 2).

Os resultados de composição centesimal das rações experimentais estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Composição Química das dietas hipercolesterolemizante com caseína (DHC), com feijão-mungo cozido (DFFC), com feijão-mungo germinado (DFFG),) Dieta Comercial (DC) e Dieta aprotéica (DA), em base seca.

Componente (%)	DHC	DFFC	DFFG	DC	DA
Umidade	6,85±0,17 <sup>a</sup>	7,24±0,20 <sup>a</sup>	7,94±0,15 <sup>b</sup>	10,21 <sup>c</sup>	10,82±0,25 <sup>c</sup>
Cinzas	4,80±0,19 <sup>c</sup>	4,12±0,063 <sup>b</sup>	5,42±0,02 <sup>d</sup>	7,78 <sup>e</sup>	2,12±0,013 <sup>a</sup>
Lipídeos	14,61±0,07 <sup>b</sup>	11,65±0,13 <sup>a</sup>	12,72±0,88 <sup>ab</sup>	3,28 <sup>c</sup>	12,40±0,35 <sup>ab</sup>
Proteínas	19,06±1,0 <sup>b</sup>	18,87±0,18 <sup>b</sup>	20,32±0,19 <sup>b</sup>	20,88 <sup>b</sup>	0,75±0,05 <sup>a</sup>
Carboidratos*	61,30±0,80 <sup>a</sup>	65,46±0,39 <sup>b</sup>	61,51±0,57 <sup>a</sup>	68,18±0,28 <sup>c</sup>	84,68±0,25 <sup>e</sup>
VET (Kcal.100g <sup>-1</sup> )	453,04	442,26	441,91	143,70	454,54

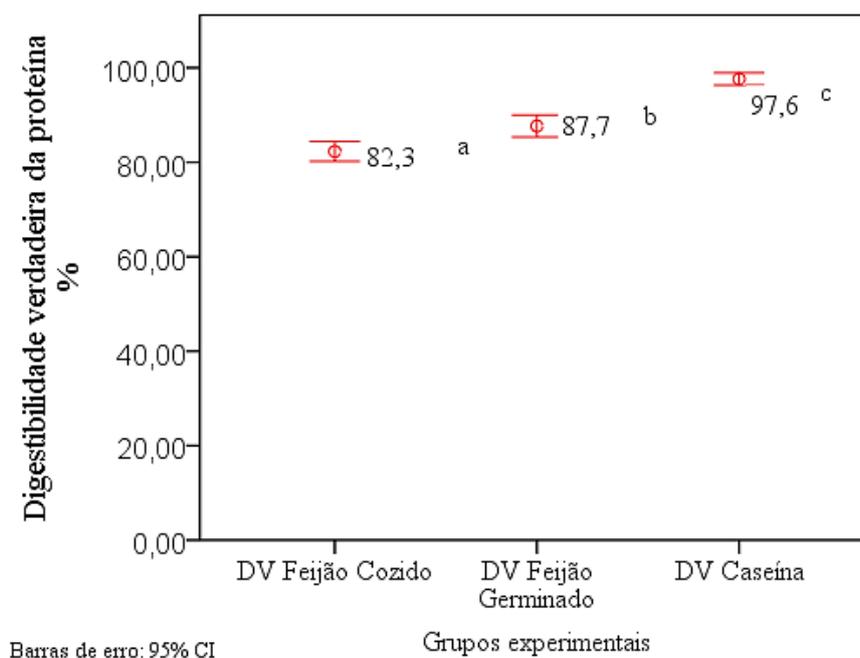
- VET – Valor Energético Total. - Média ± desvio padrão. - \*Carboidratos calculados por diferença, inclui fibras.  
- Médias seguidas de mesma letra nas linhas, dentro de cada componente químico, são iguais estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

A Dieta comercial não apresentou diferença no teor de proteína em relação as demais dietas, entretanto o teor de lipídeos foi inferior levando-se em consideração que a mesma não é hipercolesterolemizante. A Dieta com Feijão Cozido (DFFC) apresentou diferença no teor de lipídeos em relação a Dieta Hipercolesterolêmica com Caseína (DHC), entretanto, essa diferença não ocorreu entre a mesma e a DFFG, portanto, não prejudicou o experimento. Todas as formulações estavam de acordo e semelhante ao planejado (Tabela 2).

### 4.3 Ensaio biológico

#### 4.3.1 Ensaio - Digestibilidade Verdadeira da proteína

O resultado de Digestibilidade Verdadeira (DV) da proteína do Feijão mungo integral e germinado em comparação com a DV da caseína estão ilustrados na Figura 4.



**Figura 4.** Digestibilidade Verdadeira (DV) da Caseína, da proteína da Farinha de Feijão-mungo Cozido (FFC) e da proteína da Farinha de Feijão-mungo Germinado (FFG).

- Médias seguidas de mesma letra nas linhas são iguais estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

A DV da proteína de um alimento permite estimar o real aproveitamento deste nutriente pelo organismo e representa um importante parâmetro para escolhas alimentares inteligentes (BOYE; WIJESINHA-BETTONI; BURLINGAME, 2012).

A determinação da DV da proteína “*in vivo*” empregada neste estudo demonstra vantagens em relação à metodologia “*in vitro*”, já que esta última possui algumas limitações nas etapas de hidrólise e precipitação das proteínas e variações entre os diferentes procedimentos aplicados. Além disso, ensaios “*in vitro*” parecem se comportar de maneira diferente dos ensaios “*in vivo*” em relação a presença de compostos antinutricionais, especialmente inibidores de protease, possivelmente em decorrência de uma adaptação

fisiológica com produção de enzimas com efeito compensatório pelo organismo (TAVANO, et al., 2016, TAVANO; NEVES; SILVA JÚNIOR, 2008).

A DV da caseína foi superior a DV da proteína da FFC e da FFG. A caseína é apontada pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação - FAO como uma proteína de alto valor biológico com valores de digestibilidade verdadeira em torno de 99% (FAO/WHO, 1991).

A presença de fibras alimentares e fatores antinutricionais como inibidores de tripsina, quimotripsina, lectinas, fenóis e taninos nas leguminosas pode interferir na absorção e aproveitamento das proteínas visto que dificultam a hidrólise completa das mesmas pelas proteases pancreáticas o que explicaria a menor DV da FFC e da FFG em relação a caseína. Condições genéticas e agrônômicas das leguminosas podem influenciar na presença de tais fatores (DAMADORAN, 2010, GILANI; XIAO; COCKELL, 2012, PANDURANGAN, et al., 2015).

A DV da proteína da FFC neste estudo é próxima à DV da proteína “*in vivo*” de feijão preto, fava e soja cozidos observadas no estudo de Gilani e Sepehr (2003) com 83%, 82% e 81% respectivamente, e 80,4% mostrada no estudo de Rutherford et al. (2014) em feijão comum cozido.

A FFG apresentou uma DV da proteína significativamente superior a DV da proteína da FFC. Uma maior DV da proteína do feijão-mungo germinado em relação ao cozido também foi verificada no estudo de Noor, Bressani e Elias (1980) “*in vivo*”, que observou 79% no feijão-mungo cozido e 86% após 48h de germinação, entretanto, não foi observada diferença significativa após 96h de germinação. Estes mesmos autores submeteram o grão germinado ao cozimento e foi observada uma diferença significativa entre a DV da proteína dos grãos germinados e cozidos em todos os tempos avaliados (24, 48 e 96h) em relação aos grãos apenas cozidos.

Khalil (2001) observou “*in vivo*” uma diferença significativa na DV da proteína de fava cozida em autoclave (DV = 85%) em relação ao grão germinado por 72h (DV = 88%). Estes mesmos autores, entretanto, não observaram diferença significativa em relação ao grão cozido sem pressão.

Shimelis e Rakshit (2007) observaram “*in vitro*” um incremento significativo na DV da proteína de três variedades diferentes de feijão comum cru após a germinação, entretanto não foi observada diferença significativa entre os tratamentos cozidos e germinados em diferentes formas de cozimento (cozimento com e sem embebição em água; cozimento sem pressão e com pressão em autoclave) e em diferentes tempos de germinação (24h, 48h, 72h,

96h). Ao submeter os grãos germinados ao cozimento, estes autores observaram valores de DV da proteína variando de 81 a 94% proporcionando um significativo incremento em relação aos grãos que foram apenas cozidos.

Estes mesmos autores identificaram uma redução no teor fatores antinutricionais como de inibidores de tripsina, taninos, saponinas, fitatos e lectinas nos grãos após a germinação, no entanto, os processos de cozimento foram mais eficazes na redução dos mesmos, sendo que o processo de germinação combinado com o cozimento foi o que obteve melhores resultados.

Neste estudo, a FFG apresentou um teor mais elevado de CFT (Tabela 5) o que poderia prejudicar a DV da proteína da mesma, entretanto isto não ocorreu. O processo de germinação em combinação com a etapa de aquecimento e secagem em estufa a 50 °C por 72h durante o processamento da FFG pode ter contribuído para a diminuição de outros fatores antinutricionais, como os inibidores de tripsina e taninos, que são mais sensíveis ao processamento térmico, proporcionando a produção de uma farinha com maior teor de compostos bioativos e melhor DV da proteína (KALPANADEVI; MOHAN 2013)

Alguns estudos têm apontado que além da presença de fibras e fatores antinutricionais, a digestibilidade de uma proteína estaria relacionada, as suas propriedades estruturais e sequência de aminoácidos, o que faz com que mesmo proteínas com certa homologia, como é o caso das globulinas de leguminosas, possam experimentar comportamentos distintos (SALAZAR-VILLANEA et al., 2016, YANG et al., 2016).

Carbonaro et al. (2000) observou que propriedades estruturais inerentes das principais globulinas de armazenamento, 7S para feijão comum e 11S para fava, tem mais influência na limitação da digestão destas proteínas que a presença de compostos fenólicos ligados as mesmas. Ademais, o tratamento térmico empregando temperaturas muito elevadas poderia prejudicar a digestibilidade das proteínas de leguminosas.

## **4.3.2 Ensaio Principal**

### **4.3.2.1 Peso e consumo alimentar dos animais**

O peso corporal dos animais no momento inicial e final do experimento, a ingestão total, ganho de peso, consumo diário médio e Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) durante as quatro semanas com dieta experimental, dos grupos Controle Negativo (CN), Controle Positivo (CP), Grupo experimental com Farinha de Feijão integral (GFFC) e Grupo Experimental com Farinha de Feijão Germinado (GFFG) estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Peso corporal, ganho de peso, consumo diário médio e Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) dos hamsters nos grupos controle negativo (GCN), controle positivo (GCP) e grupos experimentais com farinha de feijão integral (GFFC) e germinado (GFFG).

Análise	GCN	GCP	GFFC	GFFG
Peso inicial	52,0±4,6	56,87±3,6	54,9±2,7	53,6±2,4
Peso final	130,75±3,4	134,13±4,4	141,45±2,7	140,2±2,4
Ganho de peso 28 dias	17,5±1,3 <sup>a</sup>	30±2,9 <sup>b</sup>	25,55±1,4 <sup>b</sup>	26±2,0 <sup>b</sup>
Consumo diário	9,97±0,5 <sup>b</sup>	7,95±0,3 <sup>a</sup>	9,80±0,2 <sup>b</sup>	9,34±0,3 <sup>b</sup>
CEA	6,50±0,5 <sup>a</sup>	11,56±0,7 <sup>b</sup>	9,28±0,4 <sup>b</sup>	10,27±0,8 <sup>b</sup>

Média ± erro padrão. CEA = ganho de peso/ingestão da dieta multiplicado por 100. Médias seguidas de mesma letra nas linhas são iguais estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de significância

O peso inicial dos animais não apresentou diferença significativa demonstrando homogeneidade da distribuição dos animais. O ganho de peso durante os 28 dias de experimento dos animais do GCN diferiu significativamente do demais grupos. Além disso, apesar dos animais do GCN terem ingerido uma quantidade superior de ração em relação ao GCP e uma quantidade igual ao GFFC e GFFG, apresentou um ganho de peso significativamente inferior a estes grupos no período de intervenção, bem como um menor coeficiente de ingestão alimentar.

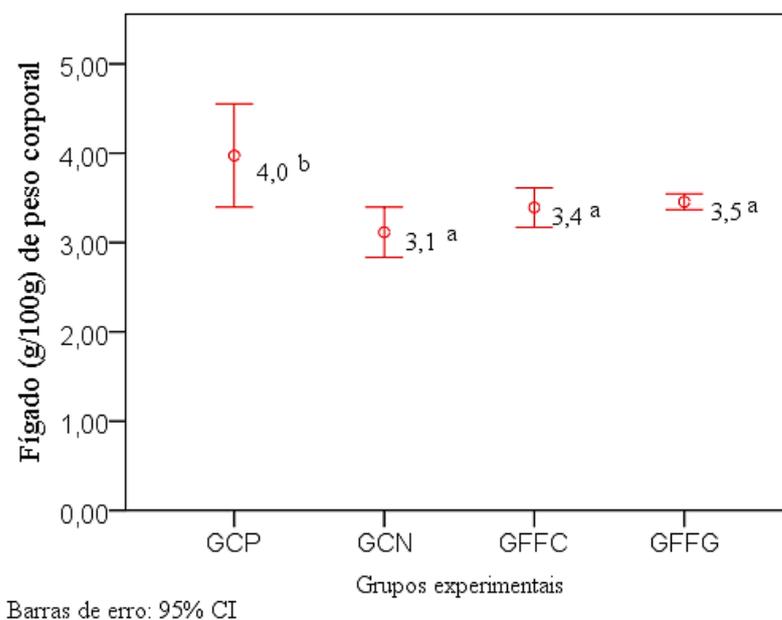
Esse resultado era esperado já que este grupo de animais não recebeu os agentes hipercolesterolemizantes na dieta, o colesterol e a gordura saturada na forma de gordura de coco. Ferreira et al. (2014) observou um maior consumo, menor ganho de peso e menor CEA no grupo que não recebeu agentes hipercolesterolemizantes em relação aos grupos experimentais hipercolesterolemizados, de forma similar a este estudo.

Os grupos GCP, GFFC e GFFG por receberem dieta com adição de gordura e colesterol apresentaram um maior ganho de peso em relação ao GCN durante os 28 dias de experimento e não houve diferença significativa no ganho de peso entre esses grupos, apesar do consumo dos animais dos grupos GFFC e GFFG terem sido significativamente maior em relação ao GCP, não houve diferença em relação ao CEA. O consumo dos animais foi *ad libitum*, sendo assim, pode ter ocorrido uma maior aceitação das rações com FFC e FFG. Fontanari et al. (2012) observaram um consumo mais elevado de ração hiperlipídica com tremoço em relação a ração com caseína.

O ganho de peso de forma homogênea entre os grupos GCP, GFFC e GFFG indica que as diferenças no perfil lipídico observadas entre esses grupos de animais não foram decorrentes de um menor acúmulo de gordura, portanto, outros mecanismos podem estar envolvidos.

### 4.3.2.2 Peso do fígado dos animais

A figura 5 ilustra os pesos médios dos fígados dos animais por 100g de peso corporal dos animais (g/100g) dos grupos controle negativo (GCN), controle positivo (GCP) e grupos experimentais com farinha de feijão integral (GFFC) e germinado (GFFG)



**Figura 5.** Peso médio do Fígado (g/100g) dos grupos controle negativo (GCN), controle positivo (GCP) e grupos experimentais com farinha de feijão integral (GFFC) e germinado (GFFG).

- Médias seguidas de mesma letra nas linhas são iguais estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

O peso do fígado (g/100g) nos animais do GCP foi significativamente superior em relação aos demais grupos e não houve diferença significativa entre os grupos GCN, GFFC e GFFG. O peso mais elevado verificado no GCP pode estar relacionado a um maior acúmulo de colesterol e ácidos graxos no fígado destes animais. Liao, Lin e Kuo et al. (2015) observaram um teor significativamente mais elevado de triglicerídeos e colesterol total no fígado de hamsters hipercolesterolemizados e um maior peso desses lipídeos em relação ao peso do fígado nos animais hipercolesterolemizados em relação aos animais não hipercolesterolemizados.

Fontanari et al. (2012) e Frota et al. (2008) observaram em hamsters hipercolesterolemizados que o peso do fígado de animais alimentados com caseína foi significativamente mais elevado em relação aos animais alimentados com farinha de tremço e feijão-caupi como fonte de proteínas, respectivamente, entretanto, estes autores não observaram diferença significativa entre os hamsters alimentados com isolado proteico destas leguminosas, sugerindo que apenas o grão integral apresenta essa relação.

Bellassoued et al. (2015) observou uma redução significativa no peso do fígado (g/100g) de ratos hipercolesterolemizados tratados com chá verde fermentado (kombucha), rico em compostos antioxidantes, em relação aos animais que não receberam o tratamento. Chen et al. (2015) também observaram este efeito em hamsters tratados com astaxantina em pó, um carotenoide com elevada atividade antioxidante.

#### 4.3.2.3 Perfil lipídico

O perfil lipídico dos animais sacrificados antes (Tempo 0 – t<sub>0</sub>) e após (Tempo 1 -t<sub>1</sub>) os 21 dias de hipercolesterolemia estão apresentados na Tabela 8. Essa medida foi realizada visando a confirmação da hipercolesterolemia induzida pela dieta nos animais.

**Tabela 8.** Perfil lipídico dos animais antes e após 21 dias de hipercolesterolemia hipercolesterolemia (Tempo 0 - t<sub>0</sub> e Tempo 1 - t<sub>1</sub>)

Parâmetros lipídicos (mg/dL)	Basal- t <sub>0</sub> (n=2)	Hipercolesterolemizados- t <sub>1</sub> (n=3)
Colesterol total	97,50±1,5 <sup>a</sup>	174,66±17,5 <sup>b</sup>
Triglicerídeos	155,00±3,0 <sup>a</sup>	186,00±4,0 <sup>b</sup>
HDL-colesterol	20,00±3,0 <sup>a</sup>	55,66±4,7 <sup>b</sup>
Colesterol não HDL (VLDL+LDL)*	77,50±1,5 <sup>a</sup>	112,50±2,5 <sup>b</sup>

- Média ± erro padrão. - Médias seguidas de mesma letra nas linhas são iguais estatisticamente, pelo teste t de student, a 5% de significância

O modelo experimental utilizando hamsters e a adição de gordura de coco e colesterol a dieta foi eficaz no estabelecimento da hipercolesterolemia no período de 21 dias, o que pode ser comprovado pela elevação de todos os parâmetros lipídicos avaliados.

Zhang et al. (2009) compararam ratos e hamsters como modelos de hipercolesterolemia e verificaram que estes animais respondem de maneira diferente ao colesterol dietético, de forma que os hamsters, assim como os seres humanos são hiper-responsivos e ratos relativamente hipo- responsivos ao aumento de colesterol e gordura na dieta. Neste estudo, a elevação do Colesterol Total (CT) e LDL-colesterol dos ratos foi inferior à dos hamsters e além disso, os ratos não apresentaram aumento dos Triglicerídeos (TG) nem do HDL- colesterol com a hipercolesterolemia.

Liao, Lin e Kuo (2015) compararam as proteínas hepáticas de hamsters hipercolesterolemizados e não hipercolesterolemizados, e de um total de 1191 proteínas identificadas, 135 foram expressas de maneira diferente no grupo hipercolesterolemizado.

O perfil lipídico dos animais após os 28 dias de tratamento (Tempo 2 – t<sub>2</sub>) com a FFC e com a FFG estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Perfil lipídico nos grupos controle negativo (GCN), controle positivo (GCP) e grupos experimentais com farinha de feijão integral (GFFC) e germinado (GFFG) no momento final do experimento (Tempo 2 – t<sub>2</sub>).

Parâmetros lipídicos	GCN	GCP	GFFC	GFFG
Colesterol total	93,14±4,1 <sup>a</sup>	191,00±12,6 <sup>c</sup>	151,44±5,3 <sup>b</sup>	145,28±6,4 <sup>b</sup>
Triglicerídeos	31,87±5,7 <sup>a</sup>	88,83± 4,5 <sup>b</sup>	68,75±7,3 <sup>b</sup>	78,00±9,3 <sup>b</sup>
HDL-colesterol	24,71±1,2 <sup>a</sup>	44,83±3,7 <sup>b</sup>	41,00±3,6 <sup>b</sup>	38,42±1.1 <sup>b</sup>
Colesterol não-HDL (VLDL+LDL)*	68,42±3,6 <sup>a</sup>	146,16±12,5 <sup>c</sup>	110,44±5,5 <sup>b</sup>	106,85±5,7 <sup>b</sup>

- Média ± erro padrão. - Médias seguidas de mesma letra nas linhas são iguais estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

-Colesterol não-HDL = Colesterol total – HDL colesterol

Hamsters mais jovens apresentam níveis séricos de TG mais elevados que hamsters adultos, o que poderia explicar a redução dos TG no t<sub>2</sub> em relação ao t<sub>0</sub> e ao t<sub>1</sub> (Tabela 8), mesmo no GCP (NAVARRO, et al., 2006). Neste estudo, todos os animais iniciaram a pesquisa com a mesma idade e passaram pelas mesmas condições simultaneamente o que garante a comparação entre os grupos. O GCN, que não recebeu agentes hipercolesterolemizante na dieta, apresentou todos os níveis séricos de perfil lipídico inferiores aos demais, incluindo TG.

Não houve diferença significativa entre o GFFC e o GFFG quanto aos parâmetros de perfil lipídico avaliados. Estes grupos se comportaram de maneira semelhante, apresentado uma redução significativa nas concentrações plasmáticas de CT e colesterol não- HDL (n- HDL- c) quando comparados ao GCP, sendo assim, tanto feijão-mungo cozido quanto o germinado apresentaram efeito hipocolesterolemizante. Não foi verificada diferença significativa nas concentrações de Triglicerídeos (TG) e HDL- colesterol (HDL-c) em relação ao GCP.

A inclusão de feijão-mungo integral a dieta, mesmo em pequenas quantidades, parece apresentar efeito. Yao et al. (2014) avaliaram em hamsters hipercolesterolemizados, o efeito de uma dieta com adição de 1% e 2% de feijão-mungo integral em relação à dieta controle hipercolesterolêmica com caseína. Após 6 semanas, não foram observadas alterações significativas no grupo com 1% de feijão, entretanto foi observada uma redução significativa no CT, n-HDL-c e TG no grupo com 2% de feijão. Apesar disso, não foram verificadas alterações nas proteínas hepáticas investigadas, provavelmente devido à baixa quantidade suplementada.

Yeap et al (2015) investigou o efeito da suplementação oral com 60, 200 e 1000 (mg/kg peso corporal) de feijão mungo fermentado, uma forma comum de consumo desta

leguminosa no Japão, em camundongos hipercolesterolemizados. Foi verificada uma redução do CT e LDL-c em todas as dosagens após 2 semanas de intervenção, com maior efeito de forma dose dependente.

Outras leguminosas também já demonstraram efeito hipocolesterolemizante. Fontanari et al. (2012) e Frota et al. (2008) em modelo experimental semelhante ao desta pesquisa, utilizando o tremço e feijão-caupi, respectivamente, verificaram uma redução significativa nas concentrações de CT e colesterol n- HDL, mesmo na presença de gordura e colesterol em excesso. Estes autores também observaram redução no CT e no n-HDL-c utilizando a proteína isolada destas leguminosas.

Mendonça et al. (2009), da mesma forma, observaram redução no colesterol plasmático de hamsters hipercolesterolemizados alimentados com isolado proteico de amaranto, em comparação a dieta controle com caseína. Estes achados indicam que características particulares das proteínas desempenham importante contribuição no efeito hipocolesterolemizante.

Ferreira et al. (2014) realizaram uma suplementação com uma dose oral de 300 mg/kg de globulina 7S isolada do feijão-caupi e do feijão-azuki em ratos hipercolesterolemizados tendo a caseína como fonte proteica na dieta. Estes animais foram comparados com um grupo controle que não recebeu a suplementação e também com um grupo controle recebendo o fármaco sinvastatina. Foi observado por esses autores uma redução significativa do CT nos grupos suplementados com as proteínas isoladas em relação ao grupo controle não suplementado, sendo que essa redução foi tão eficiente quanto a redução observada no grupo controle tratado com o fármaco sinvastatina.

Xue et al. (2017) em estudo semelhante ao realizado por Ferreira et al. (2014) mostrou em camundongos suplementados com peptídeo isolado de grão de bico, uma redução significativa do CT em relação ao grupo não suplementado, tão eficiente quando a redução no grupo tratado com sinvastatina.

Vários estudos têm sido realizados com o intuito de melhor elucidar o efeito de proteínas de leguminosas e peptídeos derivados das mesmas na redução do colesterol. Diversos mecanismos parecem estar envolvidos. Mochizuki et al. (2009) observaram uma redução na produção de Apo-B 100, um componente proteico das partículas aterogênicas, em células hepáticas tratadas com peptídeos de proteínas de soja, o que proporcionou uma supressão na secreção de LDL-c e na síntese de TG. Esta apolipoproteína é uma proteína essencial para ligação do LDL-c aos receptores celulares.

Tachibana et al. (2010) verificaram uma redução na expressão gênica de RNA mensageiros (RNAm) de SREBP-1 (Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1), um fator de transcrição regulador da expressão de genes relacionados a síntese de ácidos graxos, em ratos hipercolesterolemizados tratados com isolado proteico de soja e  $\beta$ -glicina de soja. Também foi constatada, uma redução na expressão de RNAm da enzima FSA (Ácido graxo sintase) e no RNAm da Apo-B. Em outro estudo, foi identificada redução na expressão gênica de RNAm de SREBP-1 de ratos hipercolesterolemizados pela dieta tratados com isolado proteico de feijão-mungo (TACHIBANA, et al., 2013).

Marques et al. (2015) em um modelo “*in vitro*” de simulação da digestão, verificaram a inibição da solubilização micelar do colesterol, processo essencial para a absorção do mesmo, por frações peptídicas de feijão-caupi. Provavelmente essa inibição ocorreu devido a presença de sequências de peptídeos hidrofóbicos que competem com o colesterol e ácidos biliares na organização micelar. Estes autores também observaram que os peptídeos de feijão-caupi foram capazes de inibir a enzima HMG-CoA redutase (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase), uma enzima limitante na síntese de colesterol.

Barbana, Boucher e Boye (2011) demonstraram “*in vitro*” a capacidade de proteína isolada de lentilha ligar-se aos sais biliares. Outros estudos têm mostrado “*in vitro*” que proteínas isoladas de tremoço, de colza e de soja, possuem capacidade de ligação com ácidos e sais biliares. Ademais, estudos “*in vivo*” demonstraram que proteína isolada de soja, de feijão-caupi e de tremoço promovem um aumento da excreção de colesterol e ácidos biliares nas fezes, no entanto, os grãos integrais apresentaram um efeito maior (CHOI; ADACHI; UTSUMI, 2002, FONTANARI et al. 2012, FROTA et al., 2008, HIGAKI et al., 2006, KAHLON; WOODRUFF, 2002, YOSHIE-STARK; WADA; WASCHE, 2008)

Além das proteínas, as fibras e compostos bioativos como os ácidos fenólicos, presentes nas leguminosas, também são apontados por sua capacidade de formar complexos com o colesterol, ácidos e sais biliares, diminuindo a sua absorção intestinal e aumentando a excreção nas fezes, o que leva a uma redução nas concentrações plasmáticas (MUZQUIZ, et al., 2012, TALUKDER, 2013)

Chavez-Santoscoy et al. (2015) avaliaram o efeito da adição 0,25 e 0,5% de um extrato rico em flavonoides e saponinas extraídas de feijão comum à dieta hipercolesterolemizante de camundongos e verificaram uma redução do colesterol total. Estes autores observaram uma maior excreção de ácidos biliares através da regulação positiva da enzima CYP7A1 (colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilase), enzima que regula a síntese de ácidos biliares.

Esperava-se que a FFG apresentasse um efeito hipocolesterolemizante mais acentuado em comparação a FFC, levando-se em consideração que a mesma apresenta um conteúdo mais elevado de compostos fenólicos totais, assim como maior atividade antioxidante total (Tabela 5). No entanto, isto não ocorreu, um ensaio experimental com uma intervenção mais longa (> 4 semanas) bem como, intervenções com a proteína isolada destas farinhas poderiam elucidar melhor os efeitos da germinação sobre a modulação do perfil lipídico.

Até o momento, não existem outros estudos publicados sobre o efeito de leguminosas germinadas, portanto essa investigação é importante, principalmente em relação ao feijão-mungo visto que esta é uma das principais formas de consumo desta leguminosa

#### 4.3.2.4 Marcadores de função e dano hepático

Os resultados de proteínas totais, albumina e das enzimas Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT) nos grupos experimentais estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Proteínas totais, albumina, Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT) nos grupos controle negativo (CN), controle positivo (CP) e grupos experimentais com farinha de feijão integral (GFFC) e germinado (GFFG).

Análise	GCN	GCP	GFFC	GFFG
Proteínas totais.↓	5,61±0,1	5,92 ±0,1	5,77±0,1	5,85±0,2
Albumina.↓	2,12±0,5	2,23±0,2	2,15±0,5	2,22±0,5
AST	61,42±5,7*	110,16±6,9	74,90±8,0*	56,75±7,3*
ALT	73,66±6,9*	105,16±21,5	75,70±4,1*	65,37±8,6*

Média ± erro-padrão.↓ Teste de Tukey, a 5% de significância. \* Apresenta diferença significativa comparado ao GCP pelo teste de Mann-Whitney, ao nível de significância de 5 %.

Não houve diferença significativa entre os grupos quanto aos valores séricos de proteínas totais e albumina. Entretanto, os valores de AST e ALT, dois marcadores clínicos de lesão hepática, foram significativamente superiores no grupo GCP em relação ao GCN. Este resultado indica a ocorrência de lesão hepática provocada pela deposição de lipídeos hepáticos em excesso (esteatose hepática) nos animais do GCP. Liao, Lin e Kuo et al. (2015) observaram um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de AST e ALT em hamsters hipercolesterolemizados pela dieta em comparação a animais que não foram hipercolesterolemizados.

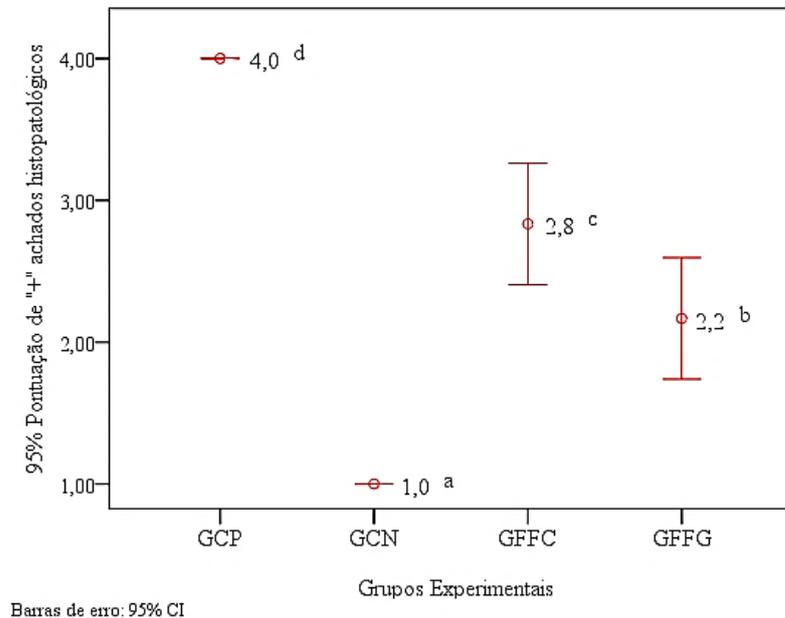
Tanto os animais alimentados com feijão-mungo integral, quanto os animais alimentados com feijão-mungo germinado apresentaram concentrações significativamente inferiores de AST e ALT em relação ao GCP, apesar de terem ingerido as mesmas quantidades de gordura saturada e colesterol. Este resultado pode indicar um efeito protetor do feijão-mungo sobre a lesão hepática ocasionada pela deposição de lipídeos hepáticos em excesso

De modo semelhante, Bellassoued et al. (2015) verificaram concentrações inferiores destas enzimas, em ratos hipercolesterolemizados pela dieta, tratados com chá verde fermentado (konbucha) em relação aos animais não tratados. Estes autores atribuíram este efeito protetor ao potencial antioxidante do chá verde fermentado. Lim et al. (2015) identificaram uma redução nas concentrações destas enzimas em ratos hipercolesterolemizados pela dieta, tratados com  $\beta$ -glucana (um açúcar complexo do tipo fibra, polissacarídeo) em relação aos animais não tratados.

Ali et al. (2012) realizaram um estudo com feijão-mungo. Estes autores observaram, em um modelo de esteatose hepática induzida pelo álcool, uma redução nas concentrações de AST e ALT em animais tratados com extrato aquoso de feijão-mungo fermentado e germinado, ricos em compostos antioxidantes, em comparação aos animais não tratados.

#### 4.3.2.5 Análises histopatológicas

Os resultados da Classificação semiquantitativa em uma escala de 1 à 4 “+” dos achados histopatológicos estão apresentados na Figura 6.



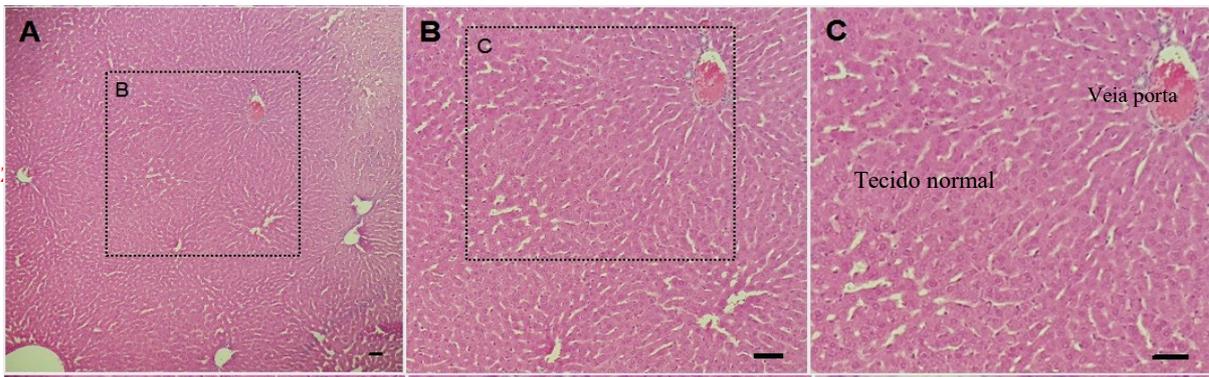
**Figura 6.** Classificação em “+” dos achados histopatológicos nos fígados dos hamsters nos grupos controle negativo (GCN), controle positivo (GCP) e grupos experimentais com feijão integral (GFFC) e germinado (GFFG)

- Médias seguidas de mesma letra nas linhas são iguais estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

A análise dos cortes histológicos foi realizada em uma escala de 1+ a 4+. A atribuição de 1+ corresponde a ausência de alterações, 2+ alterações leves, 3+ alterações moderadas e 4+ alterações graves (Tabela 3).

Todos os animais do grupo GCP foram classificados com 4+ indicando a presença de esteatose hepática no grupo inteiro. Todos os animais do GCN foram classificados com 1+ indicando que o grupo inteiro apresentava o fígado com tecido hepático normal, resultado já esperado pois estes animais não receberam agentes hipercolesterlemizantes na dieta. Os resultados do grupo GFFG foram significativamente inferiores ao GFFC e ambos foram inferiores ao GCP indicando um efeito hepatoprotetor do feijão-mungo, evidenciado pela redução na deposição de lipídeos hepáticos, sendo que o efeito do feijão germinado foi maior.

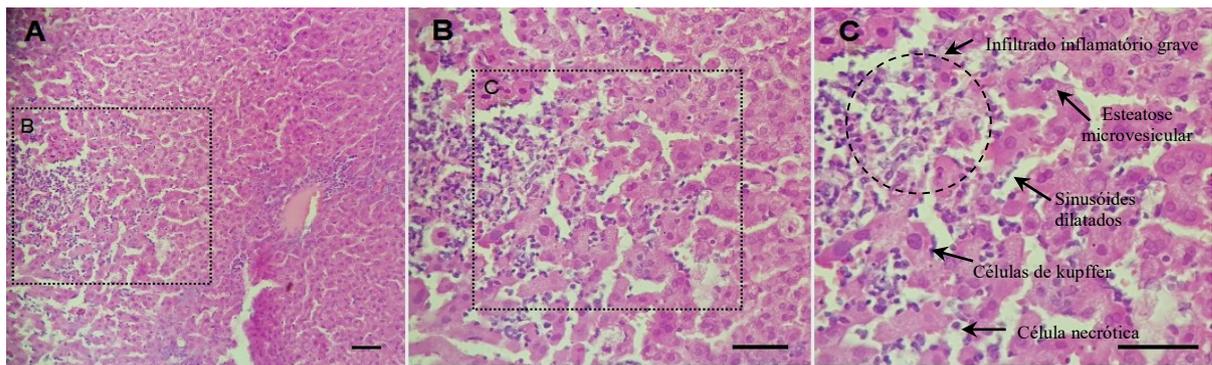
As fotomicrografias dos cortes do fígado dos animais dos grupos GCN, GCP, GFFC e GFFG e a indicação das alterações observadas estão apresentadas nas figuras 7.1, 7.2, 7.3 e 7.4 respectivamente.



**Figura 7. 1.** Prancha com fotomicrografias dos cortes do fígado do Grupo Controle Negativo (GCN).

-Fotomicrografias do tecido hepático de hamster submetidos à fixação em parafina e coloração com hematoxilina e eosina.

Observa-se na figura 7.1, hepatócitos normais, preservação do parênquima hepático e arquitetura vascular preservada caracterizando o tecido hepático normal e hígido.



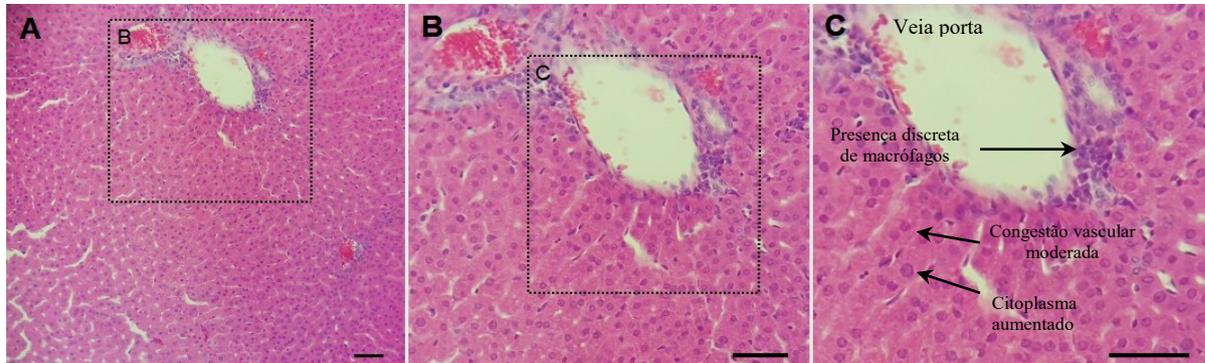
**Figura 7. 2.** Prancha com fotomicrografias dos cortes do fígado do Grupo Controle Positivo (GCP).

-Fotomicrografias do tecido hepático de hamster submetidos à fixação em parafina e coloração com hematoxilina e eosina.

Os principais achados nas lâminas histológicas dos animais do GCP (Figura 7.2) foram o acúmulo gotículas lipídicas nos hepatócitos (esteatose microvesicular), presença de áreas com severa congestão e infiltrado inflamatório grave, grande quantidade de macrófagos e células de Kupffer, degeneração vacuolar, perda da arquitetura tecidual e dos limites dos hepatócitos, extensas áreas necróticas sendo as características compatíveis com esteatose hepática (SMITH; ADAMS, 2011).

Liao, Lin e Kuo et al. (2015) também verificaram estas alterações no fígado de hamsters submetidos a hipercolesterolemia. Estes autores ao avaliarem a expressão de proteínas hepáticas, observaram uma diminuição da expressão de ACADS (Acil-CoA-desidrogenase de cadeia curta) e de ACSM (Acil-CoA-desidrogenase de cadeia média), enzimas que atuam na

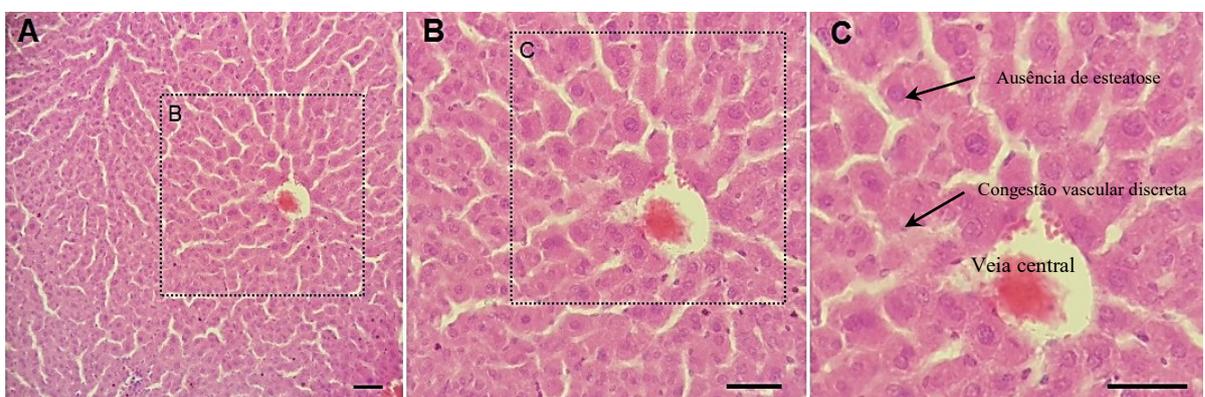
primeira etapa de oxidação dos ácidos graxos na mitocôndria, essa redução pode atenuar a oxidação de ácidos graxos, aumentando a disponibilidade dos mesmos para a síntese de TG nos hepatócitos.



**Figura 7. 3.** Prancha com fotomicrografias dos cortes do fígado do Grupo Farinha de Feijão Integral (GFFC).

-Fotomicrografias do tecido hepático de hamster submetidos à fixação em parafina e coloração com hematoxilina e eosina.e coloração com hematoxilina e eosina.

Os principais achados histopatológicos dos animais do GFFC foram a relação núcleo:citoplasma alterada, com abundância de citoplasma nos hepatócitos, congestão vascular moderada e presença discreta de macrófagos.



**Figura 7. 4.** Prancha com fotomicrografias dos cortes do fígado do Grupo Farinha de Feijão Germinado (GFFG).

-Fotomicrografias do tecido hepático de hamster submetidos à fixação em parafina e coloração com hematoxilina e eosina.

Os principais achados histopatológicos dos animais do GFFG (Figura 7.4) foram ausência de esteatose, discreto aumento da relação núcleo:citoplasma e congestão vascular moderada.

O efeito protetor de leguminosas sobre a deposição de lipídeos hepáticos e prevenção do estabelecimento da esteatose hepática, mesmo com a ingestão de gordura e

colesterol em excesso, foi verificado por outros autores, com feijão-caupi e com tremoço por Frota et al. (2008) e Fontanari et al., (2012), respectivamente. Estes autores também verificaram o mesmo efeito utilizando as proteínas isoladas desses grãos, embora com um efeito menor em relação ao grão integral., o que sugere o efeito hepatoprotetor das proteínas de leguminosas.

O estudo de Xue et al. (2017) evidenciou o efeito hepatoprotetor do peptídeo CPe- III da proteína do grão de bico, reduzindo o acúmulo de lipídeos hepáticos e promovendo uma elevação na atividade da LPL (Lipase lipoproteica) e da LH (Lipase hepática).

Foi verificado um efeito mais expressivo do feijão-mungo germinado em relação ao feijão cozido, o que pode ser atribuído a uma maior concentração de compostos com atividade antioxidante.

Alguns estudos evidenciaram que compostos bioativos com atividade antioxidante, apresentam efeito protetor sobre o dano hepático provocado pelo excesso de deposição de lipídeos nos hepatócitos. Ali et al. (2012) verificou que a suplementação oral com extrato aquoso de feijão- mungo fermentado e germinado, ricos em compostos antioxidantes, promoveram uma redução do estresse oxidativo e suprimiram o acúmulo de lipídeos hepáticos além de promover uma melhora no estresse oxidativo em animais com esteatose hepática induzida pelo álcool.

Estes mesmos achados foram observados no estudo de Liu et al. (2014) que verificaram o efeito da suplementação oral com de vixetina e isovixetina, flavonoides extraídos do feijão-mungo, em camundongos com esteatose hepática induzida pelo álcool em camundongos.

Yeap et al. (2015) realizou a suplementação oral com extrato aquoso de feijão-mungo fermentado em camundongos hipercolesterolemizados e apontou a presença de compostos fenólicos e outros compostos com atividade antioxidante capazes de reduzir a esteatose hepática e a inflamação através da regulação positiva do gene antiapoptótico Bcl2a1a.

Além disso, Chavez-Santoscoy et al. (2014) observaram que camundongos hipercolesterolemizados apresentam uma redução na expressão da enzima CPT1 (Carnitina palmitoiltransferase 1), necessária para a transferência de ácidos graxos (AG) de cadeia longa para o interior da mitocôndria, onde ocorrem os processos de oxidação dos AG. A inibição desse processo reduz a oxidação dos AG, acarretando no aumento da disponibilidade dos mesmos para a síntese de TG nos hepatócitos. Estes autores não observaram essa redução em animais que receberam dieta hipercolesterolemizante com adição de 0,25 e 0,5% de um extrato rico em flavonoides e saponinas extraídas de feijão comum. Também foi verificada neste estudo, uma regulação negativa de SREBP1e HMG-CoA redutase.

## 5. CONCLUSÕES

A germinação promoveu um incremento no teor de proteínas do feijão-mungo e uma melhora na digestibilidade da mesma. Além disso, foi observada uma elevação no teor de compostos fenólicos totais e na atividade antioxidante total pelos dois métodos estudados. Sendo assim, a germinação é uma forma de processamento que pode proporcionar melhora no conteúdo de nutrientes e compostos bioativos do feijão-mungo.

Tanto o feijão-mungo cozido quanto o feijão-mungo germinado promoveram uma redução do colesterol total e colesterol não-HDL mesmo na presença de ácidos graxos e colesterol em excesso. Assim como, reduziu as concentrações dos marcadores de lesão hepática (Aspartato aminotransferase e Alanina aminotransferase). O feijão-mungo integral proporcionou um efeito protetor sobre a deposição de lipídeos hepáticos, entretanto, o feijão-mungo germinado apresentou efeitos mais acentuados, visto que apresentou um menor infiltrado inflamatório e melhor vascularização no tecido hepático.

Levando em consideração os resultados apresentados, o feijão-mungo é uma leguminosa com características nutricionais importantes para a manutenção da saúde e a germinação, é um processamento simples e viável, que pode contribuir para uma elevação do seu valor nutricional e atividade funcional.

## REFERÊNCIAS

- AKPAPUNAM, M.A.; ACHINEWHU, S. C. Effects of cooking, germination and fermentation on the chemical composition of Nigerian Cowpea (*Vigna unguiculata*). **Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)**, v. 35, n. 4, p. 353-358, 1985.
- ANGULO, P., KEACH, J. C, BATTS, K. P, LINDOR, K. D. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 30, n. 6, p. 1356-1362, 1999.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, v. 125, n. 5, p. 989-1009, 2000.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. Washington, 2007
- BARBANA, C.; BOUCHER, A. C.; BOYE, J. I. In vitro binding of bile salts by lentil flours, lentil protein concentrates and lentil protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 174-180, 2011.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; DE CÁSSIA GONÇALVES ALFENAS, R.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARTER, P.; NICHOLLS, S.; RYE K.A.; ANANTHARAMAIAH, G.M.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A.M. Antiinflammatory Properties of HDL. **Circulation research**, v. 95, n.8 p. 764-772, 2004.
- BELLENTANI, S., SACCOCCIO, G., MASUTTI F, CROCE LS, BRANDI G, SASSO F, CRISTANINI G, TIRIBELLI C. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. **Annals of internal medicine**, v. 132, n. 2, p. 112-117, 2000.
- BENCHIMOL, K. B, CARDOSO, I. S. Esteatoepatite não alcoólica induzida por rápida perda de peso em uso de balão intragástrico: um relato de caso. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, p. 631-634, 2007.
- BARRADAS, C.; SAYÃO, F.; DUQUE, F. Feijão mungo-uma alternativa protéica na alimentação. **EMBRAPA-UAPNPBS. Comunicado Técnico**, 1989, 4p. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BR19891623350>>. Acesso em: 6 maio. 2017.
- BELLASSOUED, K.; GHRAB, F.; MAKNI-AYADI, F.; VAN PELT, J.; ELFEKI, A.; AMMAR, E. Protective effect of kombucha on rats fed a hypercholesterolemic diet is mediated by its antioxidant activity. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 11, p. 1699-1709, 2015.
- BOTHAM, K. M.; MAYES, P. A. Cholesterol synthesis, transport & excretion. In: Murray, R. K., GRANNER, D. K.; RODWELL, V. W., **Harper's illustrated biochemistry**. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2006, p. 230-240.

BOULLART, A. C. I.; DE GRAAF, J.; STALENHOF, A. F. Serum triglycerides and risk of cardiovascular disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 5, p. 867-875, 2012.

BOYE, J.; WIJESINHA-BETTONI, R.; BURLINGAME, B. Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 2, p. 183-211, 2012.

BOYE, J.; ZARE, F.; PLETCH, A. Pulse proteins: processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 414-431, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) no Brasil. 2011-2022. Brasília: **Ministério da Saúde**; 2011.

BRASIL. Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei n. 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília; (196); Seção 1:1-4, 2008.

BRASIL. Lei n. 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília. Disponível em: <[https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/LEIS/L9605.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L9605.htm)> Acesso em 04 maio de 2017.

BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 2, p. 147, 2004

BRUNZELL, J.; FAILOR, R. **Diagnosis and treatment of dyslipidemia**. In: Dale DC, ed. ACP medicine, 2006 edition. Vol. 1. New York: WebMD, 2006.

CARBONARO, M.; GRANT G.; CAPPELLONI M.; PUSZTAI, A. "Perspectives into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: antinutritional compounds or storage proteins?" **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 742-749, 2000.

CHÁVEZ-SANTOSCOY, R. A.; TOVAR, A. R.; SERNA-SALDIVAR, S. O.; TORRES, N.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A. Conjugated and free sterols from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats as cholesterol micelle disruptors and their effect on lipid metabolism and cholesterol transport in rat primary hepatocytes. **Genes and Nutrition**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2014.

CHEN, Y. LEE, P. C., WU, Y. L., LIU, L. Y. In vivo effects of free form astaxanthin powder on anti-oxidation and lipid metabolism with high-cholesterol diet. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0134733, 2015.

CHOI, S.; ADACHI, M.; UTSUMI, S. Identification of the bile acid-binding region in the soy glycinin A1aB1b subunit. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 66, n. 11, p. 2395-2401, 2002.

CORREA, I. N.; POLTRONIERI, F. Ação hipocolesterolêmica das proteínas de leguminosas. **Revista da Associação Brasileira de Nutrição-RASBRAN**, v. 7, n. 2, p. 79- 90, 2016.

DAHMER, N.; CONTERATO, I. F.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Considerações sobre o controverso e enigmático complexo phaseolus-vigna e suas espécies economicamente importantes **Revista Brasileira de Agrociência**, v.14, n.,4, p.08-18, 2008.

DAMADORAN, S. Aminoácidos, peptídeos e proteínas. In: DAMCIDARAN, S. PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. PortoAlegre: Arlmad, 2010, cap. 5, p. 180-260.

DANE-STEWART, C. A.; WATTS, G. F.; BARRETT, P. H.; STUCKEY, B. G.; MANO, T. C.; MARTINS, I. J., Redgrave, T. G. Chylomicron remnant metabolism studied with a new breath test in postmenopausal women with and without type 2 diabetes mellitus. **Clinical Endocrinology**, v. 58, n. 4, p. 415-20, 2003.

DUANGMAL, K.; SANGSUKIAM, T. Effect of Germination Period on Changes in Mungbean and Azuki Bean Protein and Amino Acid Profiles. In: **II Southeast Asia Symposium on Quality Management in Postharvest Systems 1088**. 2013. p. 563-568.

DUQUE, F. F.; PESSANHA, G. G.; QUEIROZ, P. H. S. Estudo preliminar sobre o comportamento de 21 cultivares de feijão-mungo em Itaguaí, RJ. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.22, n. 6, p. 593-598, 1987.

EL-JASSER, A. S. H. Chemical and biological properties of local cowpea seed protein grown in Gizan region. **International Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 1, n. 8, p. 88-94, 2010.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Meio-Norte. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Descrição morfoagronômica de acessos de feijão-caupi e feijão-mungo introduzidos no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Meio-Norte: dados quantitativos. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. 2008.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. **Energy and protein requirements**. Report of FAO Nutritional Meeting, Series n.52. Rome: FAO. 1973  
FAO/WHO. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. **Protein quality evaluation**. Roma, 66p. (FAO Food and Nutrition Paper, 51), 1991.

FESTI, D., COLECCHIA, A., SACCO, T., BONDI, M., RODA, E., MARCHESINI, G. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. **Obesity reviews**, v. 5, n. 1, p. 27-42, 2004.

FERREIRA, E. S.; AMARAL, A. L. S.; DEMONTE, A.; ZANELLI, C. F.; CAPRARO, J.; DURANTI, M.; NEVES, V. A. Hypocholesterolaemic effect of rat-administered oral doses of

the isolated 7S globulins from cowpeas and adzuki beans. **Journal of nutritional science**, v. 4, p. 7, 2015.

FONTANARI, G. G.; BATISTUTI, J. P.; CRUZ, R. J.; SALDIVA, P. H. N.; ARÊAS, J. A. G.; Cholesterol-lowering effect of whole lupin (*lupinus albus*) seed and its protein isolate. **Food chemistry**, v.132, n.3, p.1521–1526. 2012.

FRANÇA, B. K.; ALVES, M. R. M.; SOUTO, F. M. S.; TIZIANE, L.; BOAVENTURA, R. F.; GUIMARÃES, A.; ALVES, A. J. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199-206, 2013.

FROTA, K. M.; SANTOS FILHO, R. D.; RIBEIRO, V. Q.; ARÊAS, J. A. Cowpea protein reduces LDL-cholesterol and apolipoprotein B concentrations, but does not improve biomarkers of inflammation or endothelial dysfunction in adults with moderate hypercholesterolemia. **Nutrición Hospitalaria**, v.1, 31, n. 4, p. 1611-1619, 2015.

FROTA, K. M. G.; MATIAS, A. C. G.; ARÊAS J. A. G.; Influence of food components on lipid metabolism: scenarios and perspective on the control and prevention of dyslipidemias **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p.7-14, 2010.

FROTA, K. M. G.; MENDONÇA, S.; SALDIVA, P. H. N.; CRUZ, R. J.; AREAS, J. A. G.; Cholesterol-Lowering Properties of Whole Cowpea Seed and Its Protein Isolate in Hamsters **Journal of Food Science**, v.73, n. 9, p. 235-240, 2008.

GAEMERS, I. C, GROEN, A. K. Novos esclarecimentos sobre a patogênese da doença gordurosa não-alcóolica do fígado. **Current Opinion in Lipidology**, v. 17, p. 268-73, 2006.

GEIL, P. B.; ANDERSON, J. W. Nutrition and health implications of dry beans: a review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 13, n. 6, p. 549-558, 1994.

GENEST, J. Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.26, n. 2-3, p. 267-87, 2003.

GILANI, S.; XIAO, C.; COCKELL, K. A. Impact of antinutritional factors in food proteins on the digestibility of protein and the bioavailability of amino acids and on protein quality. **The British journal of nutrition**. v. 108, n. 2, p. 315-332. 2012.

HIGAKI, N.; HITOSHI, S. U. D. A.; SUZUKA, T.; KOMORI, T.; SAEKI, T.; NAKAMURA, Y.; KANAMOTO, R. Evidence for the existence of a soybean resistant protein that captures bile acid and stimulates its fecal excretion. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 70, n. 12, p. 2844-2852, 2006.

HUANG, X.; CAI, W.; XU, B. Kinetic changes of nutrients and antioxidant capacities of germinated soybean (*Glycine max L.*) and mung bean (*Vigna radiata L.*) with germination time. **Food chemistry**, v. 143, p. 268-276, 2014.

Institute for Laboratory Animal Research. National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, D.C: **National Academy Press** , 2010.

ISTVAN, E. Statin inhibition of HMG- CoA reductase: a 3- dimensional view. **Atherosclerosis Supplements**, v. 4, n. 1, p. 3-8, 2003.

JANICK, J.; WHIPKEY, A. **Trends in new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press. p. 424-428. 2002.

KAHLON, T. S.; WOODRUFF, C. L. In vitro binding of bile acids by soy protein, pinto beans, black beans and wheat gluten. **Food Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 425-429, 2002.

KAHLON, T.S.; SMITH, G.E.; SHAO, S.Q. In vitro binding of bile acids by kidney bean (*Phaseolus vulgaris*), black gram (*Vigna mungo*), Bengal gram (*Cicer arietinum*) and moth bean (*Phaseolus aconitifolius*). **Food Chemistry**, v. 90, n.1-2, p. 241-246, 2005.

KALPANADEV, V.; MOHAN, V. R. Effect of processing on antinutrients and in vitro protein digestibility of the underutilized legume, *Vigna unguiculata* (L.) Walp subsp. *unguiculata*. **LWT. Food Science and Technology**, v. 51, n. 2, p. 455–461, 2013.

KAVYA, N.; KAVYA, B.; RAMARÃO, V. K. KUMAR, R.; VENKATESHWARLO, G. Nutritional and therapeutic uses of mudga [*Vigna radiata* (L.) R. Wilczere] A potential interventional dietary componente. **International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy**, v.5, n.2, p.238-241. 2014.

KHALIL, M. M. Effect of soaking, germination, autoclaving and cooking on chemical and biological value of guar compared with faba bean. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 45, n. 4, p. 246-250, 2001.

KIM, D. O.; LEE, K. W.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3713–3717, 2002.

KIRK, P. Fatty Acids: Monounsaturated. In: CABALLERO, B.; ALLEN, L., PRENTICE, A. (Ed) **Encyclopedia of Human Nutrition** (Second Edition), Elsevier Inc.: Maryland Heights, MO, 2005, p. 198-205.

KUDRE, T. G.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H. Comparative study on chemical compositions and properties of protein isolates from mung bean, black bean and bambara groundnut. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 10, p. 2429–2436, 2013.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

KWITEROVICH, P.O. The metabolic parthways of high-density lipoprotein lowdensity lipoprotein and triglycerides: A current review. **American Journal of Cardiology**, v.86, n. 12, p.5-10. 2000.

LAMBRIDES, C.J.; GODWIN, I.D. Mungbean. In: CHITTARAJAN, K. **Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants**. 6 Ed. Springer, 2006.

- LANKARANI, K. B.; GHAFFARPASAND, F.; MAHMOODI, M.; LOTFI, M.; ZAMIRI, N.; HEYDARI, S. T.; GERAMIZADEH, B. Non alcoholic fatty liver disease in southern Iran: a population based study. **Hepatitis monthly**, v. 13, n. 5, 2013.
- LARGE, V.; PERONI, O.; LETEXIER, D.; RAY, H.; BEYLOT, M. Metabolism of lipids in human white adipocyte. **Diabetes & Metabolism**. v.30, n.4, p.294-309. 2004.
- LEE, R.; MARGARITIS, M.; CHANNON, K. M.; ANTONIADES, C. Evaluating Oxidative Stress in Human Cardiovascular Disease: Methodological Aspects and Considerations. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2504-2520, 2012.
- LIAO, C. C.; LIN, Y. L.; KUO, C. F. Effect of high-fat diet on hepatic proteomics of hamsters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 1869–1881, 2015.
- LIENER, Irvin E. Toxic factors in edible legumes and their elimination. **The American journal of clinical nutrition**, v. 11, n. 4, p. 281-298, 1962.
- LIM, M. Effect of polycan, a  $\beta$ -glucan originating from *Aureobasidium*, on a high-fat diet-induced hyperlipemic hamster model. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 9, n. 4, p. 1369-1378, 2015.
- LIN, S.S. Quebra de dormência de sementes do feijão mungo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 6, p. 1081-1086, 1999.
- LORENZ, K.; D'APPOLONIA, B. Cereal sprouts: composition, nutritive value, food applications. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 13, n. 4, p. 353-385, 1980.
- LOTEMBERG, A. M. P. Importância da Gordura Alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. v.53, n.5, p.595-607. 2009.
- MACHADO, A. L.; DE, L.; BARCELOS, M.; DE, F. P.; TEIXEIRA, A. H. R.; NOGUEIRA, D. A. Aliação de componentes químicos em brotos de Fabaceae para o consumo humano. **Ciência. e Agrotecnologia**, v. 33, n. 4, p. 1071-1078. 2009.
- MAGNONI, D.; STEFANUTO, A.; KOVACS, C. **Nutrição ambulatorial em cardiologia**. 1 ed. São Paulo: Sarvier; 2007. 250p.
- MAMILLA, R. K.; MISHRA, V. K., Effect of germination on antioxidant and ACE inhibitory activities of legumes. **LWT-Food Science and Technology**, v. 75, p. 51-58, 2017.
- MARCHESINI, G., BUGIANESI, E., FORLANI, G., CERRELLI, F., LENZI, M., MANINI, R., RIZZETTO, M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. **Hepatology**, v. 37, n. 4, p. 917-923, 2003.
- MARQUES, M. R.; SOARES FREITAS, R. A. M.; CORRÊA CARLOS, A. C.; et al. Peptides from cowpea present antioxidant activity, inhibit cholesterol synthesis and its solubilisation into micelles. **Food Chemistry**, v. 168, p. 288–293, 2015.
- MEJIA, E.; LUMEN, B. O. Soybean bioactive peptides: a new horizon in preventing chronic diseases, *Sexuality, Reproduction and Menopause*, v. 4, n. 2, p. 91–95, 2006.

MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORRVING, B. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. **World Health Organization**, Geneva, 2011.

MENDONÇA, S., SALDIVA, P. H., CRUZ, R. J., ARÊAS, J. A. Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. **Food Chemistry**, v. 116, n. 3, p. 738-742, 2009.

KURNIADI, M.; POELOENGASIH, C. D.; FREDIANSYAH, A.; SUSANTO, A. Content of mung bean flour prepared by various heattreatment. *Procedia Food Science*. v.3, n.1, p.69-73. 2015.

MOCHIZUKI, Y.; MAEBUCHI, M.; KOHNO, M.; HIROTSUKA, M.; WADAHAMA, H.; MORIYAMA, T.; URADE, R. Changes in lipid metabolism by soy  $\beta$ -conglycinin-derived peptides in HepG2 cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1473-1480, 2009.

MOHAMMADIFARD. N.; SARRAFZADEGAN. N.; PAKNAHAD. Z.; NOURI. F.; Inverse association of legume consumption and dyslipidemia: Isfahan Healthy Heart Program. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 8, n.6, 2014.

MOHD ALI, N.; MOHD YUSOF, H.; LONG, K.; YEAP, S. K.; HO, W. Y.; BEH, B. K.; ALITHEEN, N. B. Antioxidant and hepatoprotective effect of aqueous extract of germinated and fermented mung bean on ethanol-mediated liver damage. **BioMed research international**, v. 2013, 2012.

MOTTIN, C. C., MORETTO, M., PADOIN, A. V., SWAROWSKY, A. M., TONETO, M. G., GLOCK, L., REPETTO, G. The role of ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis in morbidly obese patients. **Obesity surgery**, v. 14, n. 5, p. 635-637, 2004.

MUBARAK, A. Nutritional composition and antinutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes. **Food Chemistry**, v. 89, n. 4, p. 489-495, 2005.

MUZQUIZ, M.; VARELA, A.; BURBANO, C.; CUADRADO, C.; GUILLAMÓN, E.; PEDROSA, M. M. Mercedes et al. Bioactive compounds in legumes: pronutritive and antinutritive actions. Implications for nutrition and health. **Phytochemistry reviews**, v. 11, n. 2-3, p. 227-244, 2012.

NAVAB, M.; ANANTHARAMAIAH, G.M.; REDDY, S.T.; Van LENTEN, B. J.; ANSELL, B. J.; FONAROW, G. C.; VAHABZADEH, K.; HANNA, S.; HOUGH, G.; KAMRANPOUR, N.; BERLINER, J. A.; LUSIS, A. J.; FOGELMAN, A. M. the oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. **Journal of lipid research**. v. 45, n.6, p. 993-1007, 2004.

NAVARRO, V.; MIRANDA, J.; CHURRUCA, I.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; RODRÍGUEZ, V. M.; PORTILLO, M. P. Effects of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on body fat and serum lipids in young and adult hamsters. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 62, n. 2, p. 81-87, 2006.

- NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger: Principles of Biochemistry, (5th Ed.). New York: W. H. Freeman and Company; p. 343-389, p.831-850, 2008.
- NEUMANN, A. I. C. P.; MARTINS, I. S.; MARCOPITO, L. F.; ARAUJO, E. A. C. Padrões alimentares associados a fatores de risco para doenças cardiovasculares entre residentes de um município brasileiro. **Revista Panamericana de Salud Pública**. v.22, n.5, p.329–39. 2007.
- NOOR, M. I.; BRESSANI, R.; ELIAS, L. G. Changes in chemical and selected biochemical components, protein quality, and digestibility of mung bean (*Vigna radiata*) during germination and cooking. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 30, n. 2, p. 135-144, 1980.
- PAJAŁ, P.; SOCHA, R.; GAŁKOWSKA, D.; ROŻNOWSKI, J.; FORTUNA, T. Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. **Food chemistry**, v. 143, p. 300- 306, 2014.
- PANDURANGAN, S. Differential response to sulfur nutrition of two common bean genotypes differing in storage protein composition. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 92, 2015.
- PINHEIRO, E. M.; CUNHA, E. M. F.; ARAÚJO, M. A.; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R.; ROCHA, M. M. Composição centesimal e efeito do cozimento no genótipo de feijão-caupi pingo de ouro-1-2. **Anais do III Congresso Nacional do Feijão-caupí (III CONAC)**, 2013.
- PIRILIO, A., NORATA, G. D., CATAPANO, A. L., LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. **Mediators Inflamm**. 2013.
- RAWSON, A.; PATRAS, A.; TIWARI, B. K.; NOCI, F.; KOUTCHMA, T.; BRUNTON, N. Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1875-1887, 2011.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; TAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p.1939-1951, 1993.
- RICHTER, C. K.; SKULAS-RAY, A. C.; KRIS-ETHERTON, P. M. Recent Findings of Studies on the Mediterranean Diet What are the Implications for Current Dietary Recommendations? **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**. v. 43, n. 4, p. 963–980, 2014.
- ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Ismael Ivan et al. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 238-244, 2008.

- SALAZAR-VILLANEA, S.; HENDRIKS, W. H.; BRUININX, E. M. A. M.; GRUPPEN, H.; VAN DER POEL, A. F. B. Protein structural changes during processing of vegetable feed ingredients used in swine diets: implications for nutritional value. **Nutrition Research Reviews**, v. 29, n. 1, p. 126-141, 2016.
- SANGAKKARA, U. R.; SOMARATNE, H. M. Sources, storage condition and quality of mungbean seeds cultivation in Sri Lanka. **Scitec Nutrition**, v. 16, n.1, p. 5-10, 1988.
- SANTOS, M. H.; BATISTA, B. L.; DA S DUARTE, S. M.; DE ABREU, C. M. P.; GOUVÊA, C. M. C. P. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade do café (*Coffea arabica*). *Quimica Nova*. v. 30, n.1, p. 604-610, 2007.
- SHIMELIS, E. A.; RAKSHIT, S. K. Effect of processing on antinutrients and in vitro protein digestibility of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in East Africa. **Food Chemistry**, v. 103, n. 1, p. 161-172, 2007.
- SIQUEIRA, A. F. A., ABDALLA, D. S. P., FERREIRA, S. R. G. LDL: da Síndrome Metabólica à Instabilização da Placa Aterosclerótica. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol 50 nº 2 Abril 2006
- SLEIMAN, D.; AL-BADRI M, R.; AZAR, S. T. Effect of Mediterranean diet in diabetes control and cardiovascular risk modification: a systematic review. **Front. Public Health**, v. 3, n. 69, 2015.
- SMITH, B. W.; ADAMS, L. A. Non-alcoholic fatty liver disease. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 48, n. 3, p. 97-113, 2011.
- SODER, R. B.; BALDISSEROTTO, M. Esteatose hepática na obesidade infantil: investigação por imagem. **Scientia Medica**, v. 19, n. 4, p. 202-208, 2009.
- SOLONI, F. G. Simplified manual micro-method for determination of serum triglycerides. **Clinical Chemistry**, v. 17, p. 527-534, 1971.
- SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology, Campinas**, v. 14, n. 3, p. 202-210, 2011.
- SPECTOR, A. A. Plasma lipid transport. **Clinical Physiology and Biochemistry**. v.2, n.2-3, p.123-34. 1984.
- STEELE, W. M.; MEHRA, K. L. Structure, evolution, and adaptation to farming systems and environment in *Vigna*. In: SUMMERFIELD, R.J.; BUNTING, A.H (Eds.) *Advances In Legumes Science* Surrey. England: University of Reading, p.393-404, 1978.
- SVIRIDOV, D.; NESTEL P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. **Atherosclerosis**. v.161, n.2, p.245-254. 2002.
- SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Punnus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolics constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v. 19, n. 1, p. 63-68, 1959.

TACHIBANA, N.; IWAOKA, Y.; HIROTSUKA, M.; HORIO, F.; KOHNO, M.  $\beta$ - Conglycinin lowers very-low-density lipoprotein-triglyceride levels by increasing adiponectin and insulin sensitivity in rats. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 74, n. 6, p. 1250-1255, 2010.

TACHIBANA, N.; WANEZAKI, S.; NAGATA, M.; MOTOYAMA, T. Intake of Mung Bean Protein Isolate Reduces Plasma Triglyceride Level in Rats. **Functional Foods in Health and Disease**, v. 3, n. 9, p. 365–376, 2013.

TALUKDER, S. Effect of dietary fiber on properties and acceptance of meat products: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, n. 7, p. 1005-1011, 2015.

TANG, D.; DONG, Y.; REN, H.; LI, L.; HE, C. A. review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common food mung bean and its sprouts (*Vigna radiata*). **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. 4, 2014<sup>a</sup>.

TANG, D.; DONG, Y.; GUO, N.; LI, L.; REN, H. Metabolomic analysis of the polyphenols in germinating mung beans (*Vigna radiata*) seeds and sprouts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 8, p. 1639-1647, 2014<sup>b</sup>.

TAVANO, O. L.; DA SILVA JR, S. I.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. Nutritional responses of rats to diets based on chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed meal or its protein fractions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 22, p. 11006-11010, 2008.

TAVANO, O. L.; NEVES, V. A.; DA SILVA JÚNIOR, S. I. In vitro versus in vivo protein digestibility techniques for calculating PDCAAS (protein digestibility-corrected amino acid score) applied to chickpea fractions. **Food Research International**, v. 89, p. 756-763, 2016.

TICKOO, J. L.; SATYANARAYANA, A. Progress in mung bean breeding research with special emphasis on disease and insect resistance, constraints, and future directions. In: INTERNATIONAL CONSULTATION WORKSHOP ON MUNGBEAN, 1997, New Delhi, Índia. Proceedings. Tainan, Taiwan: AVRDC, p. 58-77. 1998.

VAYUPHARP B.; LAKSANALAMAI, V. Nutrients and anti-nutrients of high chlorophyll-mungbean sprouts as affected by different periods of germination and sprouting stages. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 6, n. 4, p. 121-129, 2013.

VAZ, J. S.; DEBONI, S.; AZEVEDO, M. J.; GROSS, J. L. ZELMANOVITZ, T. Ácidos graxos como marcadores biológicos da ingestão de gorduras. **Revista de Nutrição**, v.19 n. 4, p. 489-500, 2006.

VIEIRA, R. F.; NISHIHARA, M. K. Comportamento de cultivares de mungo-verde (*Vigna radiata*) em Viçosa, Minas Gerais. **Revista Ceres**, v. 39, n. 221, p. 60-83, 1992.

VIEIRA, R. F.; OLIVEIRA, V. R.; VIEIRA, C. Cultivo do feijão-mungo-verde no verão em Viçosa e em Prudente de Moraes. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 37-43, 2003.

VIEIRA, R. F.; PAULA JÚNIOR, T. J.; JACOB, L. L.; LEHNER, M. S.; SANTOS, J. Desempenho de genótipos de feijão-mungo-verde semeados no inverno na Zona da Mata de Minas Gerais. **Revista Ceres**, v. 58, n.3, p. 402-405, 2011.

WANG, D. Q. H. Regulation of intestinal cholesterol absorption. **Annual Review of Physiology**, v. 69, p. 221-248, 2007.

WARNICK, G. R.; WOOD, P. D. National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of high-density lipoprotein cholesterol: executive summary. **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 10, p. 1427-1433, 1995.

WHO 2009. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. (Geneva: World Health Organization), 2009.

WHO 2015. Cardiovascular diseases (CVDs) Fact sheet N°317 Updated, 2015<sup>a</sup>. WHO- Obesity and overweight. Fact sheet N°311. 2015<sup>b</sup>.

WONGSIRI, S.; OHSHIMA, T.; DUANGMAL, K. Chemical Composition, Amino Acid Profile and Antioxidant Activities of Germinated Mung Beans (*Vigna radiata*). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 1956-1964, 2015.

WRIGHT, D. J. BUMSTEAD, M. R. Legume proteins in food technology. *Philos. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 304, n.1120, p. 381-393, 1984.

XAVIER, H. T., IZAR, M. C., FARIA NETO, J. R., ASSAD, M. H., ROCHA, V. Z., SPOSITO, A. C., FALUDI, A. A. V Diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 101, n. 4, p. 1-20, 2013.

XUE, Z.; WANG, C.; ZHAI, L.; YU, W.; CHANG, H.; KOU, X.; ZHOU, F. Bioactive compounds and antioxidant activity of mung bean (*Vigna radiata* L.), soybean (*Glycine max* L.) and black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during the germination process. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 34, n. 1, p. 68–78, 2016.

XUE, Z. Lipid metabolism potential and mechanism of CPe-III from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Food Research International**, 2017.

YANG, Y.; WANG, Z.; WANG, R.; SUI, X.; QI, B.; HAN, F.; LI, Y.; JIANG, L. Secondary Structure and Subunit Composition of Soy Protein in Vitro Digested by Pepsin and Its Relation with Digestibility. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

YAO, Y.; HAO, L.; SHI, Z.; WANG, L.; CHENG, X.; WANG, S.; REN, G. Mung Bean Decreases Plasma Cholesterol by Up-regulation of CYP7A1. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, n. 2, p. 134–136, 2014.

YEAP, S. K.; BEH, B. K.; HO, W. Y.; MOHD YUSOF, H.; MOHAMAD, N. E.; ALI, N. M.; JAGANATH, I. B.; ALITHEEN, N. B.; KOH, S. P.; LONG, K. In vivo antioxidant and hypolipidemic effects of fermented mung bean on hypercholesterolemic mice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

YOSHIE-STARK, Y.; WADA, Y.; WÄSCHE, A. Chemical composition, functional properties, and bioactivities of rapeseed protein isolates. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 32-39, 2008.

ZHANG, X.; SHANG, P.; QIN, F.; ZHOU, Q.; GAO, B.; HUANG, H.; YANG, H.; SHI, H.; LUCY YU, L. Chemical composition and antioxidative and anti-inflammatory properties of ten commercial mung bean samples. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 171–178, 2013.

ZHANG, Z.; WANG, H.; JIAO, R.; PENG, C.; WONG, Y. M.; YEUNG, V. S. Y.; HUANG, Y.; CHEN, Z. Y. Choosing hamsters but not rats as a model for studying plasma cholesterol-lowering activity of functional foods. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, n. 7, p. 921–930, 2009.

ZHENG, J. X. Functional foods - Second volume. Beijing: **China Light Industry Press**, 1999.