UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Avaliação em ratos do efeito do óleo da semente de romã (*Punica granatum* L.) sobre o perfil lipídico tecidual e sua influência sobre parâmetros bioquímicos em processos oxidativos

Illana Louise Pereira de Melo

Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Tit. Jorge Mancini Filho

São Paulo - SP
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Avaliação em ratos do efeito do óleo da semente de romã (*Punica granatum* L.) sobre o perfil lipídico tecidual e sua influência sobre parâmetros bioquímicos em processos oxidativos

Illana Louise Pereira de Melo

Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Tit. Jorge Mancini Filho

São Paulo - SP
2012

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Melo, Illana Louise Pereira de
M528a Avaliação em ratos do efeito do óleo da semente de romã (*Punica granatum* L.) sobre o perfil lipídico tecidual e sua influência sobre parâmetros bioquímicos em processos oxidativos / Illana Louise Pereira de Melo. -- São Paulo, 2012.
169p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Orientador : Mancini Filho, Jorge

1. Nutrição : Ciência dos alimentos 2. Alimentos : Química 3. Ácido graxo : Produtos naturais 4. Estresse oxidativo I. T. II. Mancini Filho, Jorge, orientador.

641.1 CDD

Illana Louise Pereira de Melo

Avaliação em ratos do efeito do óleo da semente de romã (*Punica granatum* L.) sobre o perfil lipídico tecidual e sua influência sobre parâmetros bioquímicos em processos oxidativos

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Tit. Jorge Mancini Filho
Presidente/Orientador

_____
1º Examinador

_____
2º Examinador

_____
3º Examinador

_____
4º Examinador

São Paulo, _____ de 2012.

Dedico este trabalho aos meus pais:

Ivo Pereira,

exemplo de honestidade, paciência e educação;

Maria de Fátima,

exemplo de cuidado, carinho e dedicação;

Pelo amor incondicional, apoio e torcida constantes, mesmo contrariados com a minha ausência durante todos esses anos... Vocês, que me apresentaram à importância da família, são os alicerces da minha vida...

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Dr. Jorge Mancini Filho, exemplo de profissionalismo, respeito e competência; agradeço por me receber tão bem em seu grupo de pesquisa, pela indicação do tema, confiança, atenção e conhecimentos repassados.

À FAPESP (Fundação de Aparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela bolsa de estudos (Proc. 2009/51890-0) e pelo auxílio à pesquisa (Proc. 2009/51891-7), tornando viável o desenvolvimento do trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Aos funcionários, sempre prestativos, do Biotério de Experimentação (FCF/IQ), da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FCF) e dos setores de convênios e informática da FCF; bem como às queridas Rose e Suzi pela atenção e suporte oferecidos.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação: Elaine Ychico e Jorge de Lima, bem como aos funcionários da Secretaria do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental: Edílson, Mônica, Cléo e Roberta; pelo auxílio, atenção, carinho e eficiência. Agradeço ainda a Joana e a queridíssima Lurdinha, pela ajuda com a organização e limpeza do laboratório, pelo carinho e alegria proporcionada nos momentos “do cafezinho”.

À minha banca de qualificação: Dr^{a}. Ursula M. L. Marquez, Dr. Luiz A. Gioielli e Dr^{a}. Deborah H. M. Bastos, pela atenciosa correção do trabalho e preciosas sugestões; e a todos os professores do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, que de uma forma ou de outra contribuíram para o meu crescimento e aprendizado. Em especial agradeço ao Prof. Eduardo Purgatto, pela atenção e apoio técnico oferecido no uso do programa *Quantity One*.

Ao Prof. Dr. Claudio A. Bernal, coordenador da rede temática CYTED (*Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnologia para el Desarrollo*) - 208RT0343, pela oportunidade de desenvolver o estágio na Cátedra de Bromatologia y Nutrición de La Universidad Nacional Del Litoral (Santa Fé, Argentina); bem como a sua equipe, em especial a Marcela González, e aos companheiros brasileiros (Marcos e Hosana) que também estiveram trabalhando no Laboratório de Bromatologia y Nutrición no mesmo período. Obrigada pela acolhida, atenção, carinho e ensinamentos prestados. Conhecer e trabalhar com vocês foi uma experiência maravilhosa.

Ao Prof. Dr. Aléxis Vidal J. Novoa, um pesquisador exemplar, cujas temporadas no Brasil tornaram nossos dias intensos, com muito trabalho e aprendizado, mas também cheios de alegrias.

À Profª. Dalva A. P. Mancini e o técnico José Ricardo do Laboratório de Virologia do Instituto Butantã, pela oportunidade, disponibilidade, parceria e ensinamentos com a técnica de RT-PCR.

À Profª. Drª. Sandra H. P. Farsky, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, bem como seus alunos Isabel Machado e José Roberto, pela disponibilidade, atenção, carinho e ensinamentos. Obrigada pela parceria que me proporcionou novos conhecimentos e que, apesar dos resultados não estarem apresentados nesta tese, serão de grande valor para a continuidade do trabalho com o óleo da semente de romã.

À Profª. Drª. Ligia B. de Almeida-Muradian, que me orientou no mestrado e continuou me ajudando durante o doutorado. Obrigada pela lembrança em momentos importantes e por sempre abrir as portas do seu laboratório quando precisei. Agradeço também a Elias Araújo e José Augusto Sattler, que me ajudaram na análise da vitamina E e que se tornaram, em pouco tempo, amigos muito queridos; bem como à Adriane Melo e Bianca Souza. Obrigada por compartilharem momentos maravilhosos de descontração que tornaram meus dias mais fáceis e felizes.

Aos também integrantes do Laboratório de Análise de Alimentos: Rosa Maria, Isabel Massaretto, Simone Faria, Alexandre Bera, Renato Souza, Vanilda Arruda, Diana, Fabiana, Natasha, Davi e Gabriel; por sempre me receberem com carinho, pela prestatividade, conversas e momentos de descontração.

À Luciana Tedesco Yoshime, um grande presente na minha vida, por estar sempre ao meu lado, mesmo quando separadas pela distância e pela correria da vida diária. Não tenho palavras para descrever toda gratidão e carinho que tenho por você. Você que sempre esteve disponível e tanto me socorreu desde o mestrado, e mais ainda no doutorado; seja com trabalhos técnicos (figuras, estruturas, consultorias, etc., além da ajuda nos dias de eutanasia), seja no emocional (me escutando, aconselhando, sofrendo junto, rindo junto...). Você é mais que uma amiga e estará sempre em meu coração. Obrigada por tudo!

À Bárbara Bicalho e Karla Oliveira, amigas mais que queridas, conquistadas durante o mestrado e que serão levadas para toda vida. Obrigada pela amizade, pelas conversas, companhia e momentos maravilhosos.

A Elma Regina, pela maravilhosa acolhida durante o Congresso em Aracaju, e a Michelle Garcêz. Obrigada pelo carinho, alegria e momentos de descontração compartilhados.

Aos técnicos dos laboratórios de Nutrição-Minerais e de Nutrição e Esportes: Alexandre Pimentel e Ivanir Santana, respectivamente; bem como aos alunos, pelo carinho, atenção e prestatividade sempre que precisei da ajuda deles. Em especial, agradeço a:

- ✓ Liliane Piris, pela ajuda, carinho e amizade. Obrigada pelo companheirismo e pelos momentos maravilhosos que muitas vezes alegraram e suavizaram os meus dias. Destaco ainda a participação do trio Luciene, Leila e Verônica em muitos desses momentos, compartilhando alegrias e gostosas risadas.

- ✓ Ariana Rocha, pela maravilhosa companhia na viagem para Espanha, pela alegria e espontaneidade que tanto me fez sorrir, pelo carinho e amizade.

- ✓ Francisco Leonardo, Emídio Matos e Lucas Pantaleão, pela ajuda nos dias de eutanasia e em todos os momentos que eu solicitei, além do carinho e momentos de descontração. A amizade e a colaboração de vocês neste trabalho foram valiosas.

À todos aqueles que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Lípides: Rosângela Pavan (técnica), Fernanda Jardini, Ana Mara, Eliane Bonifácio, Lucillia Rabelo, Milessa Afonso, Claudimar Oliveira, Felipe Gomes, Paula Garcia, Danilo Akiau, Fernanda Shinagawa e Fernanda Santana; não só pela pareceria de trabalho, ajuda, luta diária e companheirismo, mas principalmente pelos momentos de descontração, carinho e amizade oferecidos. Deixo ainda, o meu agradecimento aquelas que estiveram apenas de passagem durante seus estágios no laboratório, mas que trouxeram carinho, trocaram conhecimentos e deixaram saudade: Ana Elza, Janaína Valéria, Ana Carolina Rabelo e Ana Carolina Pereira. Em especial, agradeço a:

- ✓ Eliane Bonifácio, pela parceira no trabalho com os conjugados, além das palavras de apoio, conversas, desabafos, discussões e risadas compartilhadas. Obrigada pelo carinho e amizade especial.

- ✓ Ana Mara Silva, pela preciosa ajuda e parceria oferecida durante todo o desenvolvimento deste trabalho, pelo exemplo de profissional a ser seguido mostrando sempre muita dedicação e amor pela pesquisa. Mas, obrigada principalmente pelo carinho, incentivo, pelas conversas intermináveis, por muitas vezes me guiar em decisões importantes ou simplesmente falar as verdades que precisava ouvir. Agradeço imensamente por poder compartilhar sua amizade.

- ✓ As “Fernandas” (Shina e Santa), pelo companheirismo não só no laboratório, mas também na moradia que, recentemente, tornou-se um ambiente de muitas alegrias. Obrigada pelo carinho, paciência, convivência, amizade e ajuda, dentro e fora do laboratório.

E por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus pais, irmão (Braz Neto), cunhada (Mirella) e adorados sobrinhos (Isabella e Fellipe), família que tanto amo e me orgulho, pelo carinho, amor e alegrias proporcionadas nos meus momentos na “terrinha maravilhosa” (Natal-RN); à Rodrigo Holanda, pelo incentivo, apoio, amor e companhia ao longo dessa trajetória; e aos queridos avós, tios, primos e amigos, pelo carinho e torcida constantes, tão importantes ao longo dessa caminhada.

MUITO OBRIGADA!

"É melhor tentar e falhar, do que preocupar-se e ver a vida passar,
É melhor tentar ainda que em vão, do que sentar-se fazendo nada até o final,
Eu prefiro na chuva caminhar, do que em dias tristes em casa me esconder,
Eu prefiro ser feliz embora louco, do que em conformidade viver"

Martin Luther King

SUMÁRIO

Página

RESUMO GERAL..... I
ABSTRACT..... II
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... III
LISTA DE FIGURAS..... VII
LISTA DE TABELAS..... XI

INTRODUÇÃO GERAL..... 1
1 Justificativa..... 3
2 Referências..... 4

CAPÍTULO I

ÓLEO DA SEMENTE DE ROMÃ (*Punica granatum* L.): UMA FONTE DE ÁCIDO α-LINOLÊNICO CONJUGADO (ÁCIDO PUNÍCICO)..... 7

1 INTRODUÇÃO..... 8

2 A ROMÃ..... 9
2.1 Óleo da semente de romã..... 11
2.1.1 Ácido Punícico..... 14
2.2 Efeitos do PSO na saúde..... 14

3 ÁCIDO α-LINOLÊNICO CONJUGADO..... 17
3.1 Fonte, biossíntese e isômeros dos CLNAs..... 17
3.2 Metabolismo e incorporação dos CLNAs..... 19
3.3 Efeitos dos CLNAs no organismo..... 23
3.3.1 Composição corporal, perfil lipídico e metabolismo da glicose..... 23
3.3.2 Atividade antioxidante dos CLNAs..... 26
3.3.3 Ação molecular dos CLNAs..... 28

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 30

5 REFERÊNCIAS..... 30

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO DA IDENTIDADE, QUALIDADE E ESTABILIDADE DO ÓLEO DA SEMENTE DE ROMÃ (*Punica granatum* L.)..... 37

1 INTRODUÇÃO..... 38

2 OBJETIVOS..... 40

2.1 Objetivo geral..... 40

2.2 Objetivos específicos..... 40

3 MATERIAL E MÉTODOS..... 40

3.1 Material..... 40

3.2 Métodos..... 41

3.2.1 Perfil de ácidos graxos nos óleos..... 41
3.2.2 Conteúdo de tocoferóis e fitosteróis nos óleos..... 43
3.2.3 Características de qualidade dos óleos..... 44
3.2.4 Estabilidade oxidativa dos óleos..... 47
3.2.5 Análise estatística..... 48

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 49

4.1 Perfil de ácidos graxos nos óleos..... 49

4.2 Conteúdo de tocoferóis e fitosteróis nos óleos..... **53**

4.3 Características de qualidade dos óleos..... 55

4.4 Estabilidade oxidativa dos óleos..... 56

5 CONCLUSÕES..... 59

6 REFERÊNCIAS..... 60

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO EM RATOS DO EFEITO DO ÓLEO DA SEMENTE DE ROMÃ (Punica grantum L.) SOBRE O PERFIL LIPÍDICO E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E OXIDATIVOS TECIDUAIS..... 65

1 INTRODUÇÃO..... 66

2 OBJETIVOS..... 67

2.1 Objetivo geral..... 67

2.2 Objetivos específicos..... 68

3 MATERIAL E MÉTODOS..... 68

3.1 Material..... 68

3.2 Métodos..... 69

3.2.1 Ensaio biológico..... 69
3.2.2 Parâmetros bioquímicos no soro..... 71
3.2.3 Perfil de ácidos graxos nos tecidos..... 71
3.2.4 Morfometria dos tecidos hepático, muscular e adiposo..... 72
3.2.5 Homogeneizados dos tecidos e quantificação das proteínas..... 73
3.2.6 Peroxidação lipídica..... 74
3.2.7 Atividade das enzimas antioxidantes..... 75
3.2.8 Análise estatística..... 76

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 78
4.1 Consumo de ração, ganho de peso e peso dos tecidos..... 78
4.2 Parâmetros bioquímicos do soro..... 82
4.2.1 Teste oral de tolerância à glicose e glicemia de jejum..... 82
4.2.2 Lipidograma e transaminases no soro..... 84
4.3 Lipídeos totais e perfil de ácidos graxos nos tecidos..... 87
4.4 Morfometria dos tecidos hepático, muscular e adiposo..... 100
4.5 Peroxidação lipídica..... 106
4.6 Atividade das enzimas antioxidantes..... 109
4.7 Análises de correlação e estatística multivariada..... 116
5 CONCLUSÕES..... 120
6 REFERÊNCIAS..... 121

CAPÍTULO IV

AVALIAÇÃO EM RATOS DO EFEITO DO ÓLEO DA SEMENTE DE ROMÃ (*Punica granatum* L.) SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO TETRACLORETO DE CARBONO..... 129
1 INTRODUÇÃO..... 130
2 OBJETIVOS..... 132
2.1 Objetivo geral..... 132
2.2 Objetivos específicos..... 132
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 133
3.1 Material..... 133
3.2 Métodos..... 133
3.2.1 Ensaio biológico..... 133
3.2.2 Transaminases no soro..... 134
3.2.3 Perfil de ácidos graxos no tecido hepático..... 134
3.2.4 Morfometria do tecido hepático..... 135
3.2.5 Homogeneizado do tecido hepático e quantificação das proteínas..... 135
3.2.6 Peroxidação lipídica e atividade das enzimas antioxidantes..... 136
3.2.7 Expressão gênica da SOD e CAT no tecido hepático..... 137
3.2.8 Análise estatística..... 138
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 138
4.1 Transaminases no soro..... 138
4.2 Lipídeos totais e perfil de ácidos graxos no tecido hepático..... 139
4.3 Morfometria do tecido hepático..... 141
4.4 Peroxidação lipídica..... 144
4.5 Atividade e expressão gênica das enzimas antioxidantes..... 145

4.6 Análise de estatística multivariada..... 148

5 CONCLUSÕES..... 150

6 REFERÊNCIAS..... 150

CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 153

ANEXOS 155

RESUMO GERAL

MELO, I.L.P. **Avaliação em ratos do efeito do óleo da semente de romã(*Punica granatum* L.) sobre o perfil lipídico tecidual e sua influência sobre parâmetros bioquímicos em processos oxidativos.** [Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.]

O objetivo geral deste estudo foi avaliar, em ratos, o efeito do óleo da semente de romã (PSO) sobre o perfil lipídico tecidual e sua influência sobre parâmetros bioquímicos em processos oxidativos. Foi realizada a caracterização do PSO, confirmando a presença do ácido punícico (PA; 55%) como ácido graxo majoritário e a alta concentração de fitosteróis (539mg/100g), bem como a presença de vitamina E (175mg/100g). O PSO apresentou-se dentro dos padrões de qualidade e a sua estabilidade oxidativa foi melhor em comparação ao óleo de linhaça. A suplementação de ratos saudáveis com o PSO, por via intragástrica durante 40 dias, não afetou o ganho de peso total e o peso dos tecidos muscular (gastrocnêmio) e adiposos (epididimal e retroperitonial). No entanto o PA foi metabolizado e incorporado na forma de ácido linoléico conjugado, sendo dose-dependete nos tecidos hepático, muscular, cardíaco, renal e adiposos. No cérebro, não foram observados ácidos graxos conjugados, mas as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) apresentaram-se significativamente reduzidas nos animais suplementados com PSO, em relação ao controle. De modo geral, os resultados mostram que o PSO não provoca alterações no metabolismo lipídico e não participa do processo de inibição da oxidação em animais saudáveis. Em ratos submetidos ao estresse oxidativo hepático pelo tetracloreto de carbono (CCl_4), a suplementação com PSO durante 21 dias não foi capaz de prevenir o quadro de estresse oxidativo, indicando que este óleo não tem efeito antioxidante utilizando esse modelo animal; embora a análise histológica tenha mostrado menores áreas lesionadas no parênquima hepático nos grupos tratados. Os resultados obtidos neste trabalho contribui com a literatura fornecendo mais informações a respeito do uso dos ácidos graxos conjugados, bem como do PSO em organismos saudáveis e submetidos à estresse oxidativo.

Palavras chave: óleo da semente de romã, ácido graxo conjugado, incorporação tecidual, estresse oxidativo.

ABSTRACT

MELO, I.L.P. **Evaluation of the effects of pomegranate seed oil (*Punica granatum* L.) on tissue lipid profile and its influence on biochemical parameters in oxidative processes of rats.** [Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo - Brazil, 2012.]

The aim of this study was to evaluate the effect of pomegranate seed oil (PSO) on tissue lipid profile and its influence on biochemical parameters in oxidative processes of Wistar rats. Characterization of PSO was carried out, confirming the presence of the punicic acid (PA, 55%) as the major fatty acid present in the oil and high concentrations of phytosterols (539mg/100g) were also observed, as well as the presence of vitamin E (175mg/100g). The PSO was within quality standards and it presented a higher oxidative stability as compared to flaxseed oil. The supplementation of healthy rats with the PSO via gavage during 40 days did not affect weight gain and total weight of muscle (gastrocnemius) and adipose (epididymal and retroperitoneal) tissues. However, PA was metabolized and incorporated as CLAs in a dose-dependent manner in the liver, muscle, heart, kidney and adipocytes. In the brain, conjugated fatty acids were not detected, but the values of thiobarbituric acid reactive substances were significantly reduced in animals supplemented with PSO as compared to the control group. Overall, the results showed that the PSO caused no changes in the lipid metabolism and did not inhibit tne oxidation in healthy animals. In rats that underwent hepatic oxidative stress by carbon tetrachloride (CCl_4), the PSO supplementation for 21 days was not able to prevent the oxidative stress, indicating that this oil has no antioxidant effect using this animal model; although histological analysis has shown less injured areas in the liver parenchyma in the test groups. The results obtained in this study are a good addition to the literature once it provided more information about the use of conjugated fatty acids as well as garnered useful information about the effects of consumption of PSO in oxidative stress-induced rats.

Keywords: pomegranate seed oil, conjugated fatty acid, tissue incorporation, oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ACAT	Acil-CoA colesterol acil transferase
ACP	Análise por Componentes Principais
AG	Ácido graxo
AGC	Ácido graxo conjugado
AHA	Análise Hierárquica de Agrupamentos
ALT	Alanina amino transferase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ApoB	Apolipoproteína B
AST	Aspartato aminotransferase
BF_3	Trifluoreto de boro
BHT	Butilhidroxitolueno
BSA	Albumina bovina sérica
c	*Cis*
CAT	Catalase
CC	Condições cromatográficas
CCl_3•	Radical triclorometil
CCl_3O_2•	Radical peroxil triclorometil
CCl_4	Tetracloreto de carbono
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEA	Coeficiente de eficácia alimentar
CEUA	Comissão de Ética em Uso Animal
CG	Cromatógrafo gasoso
CH_2	Grupo metileno
CLA	Ácido linoléico conjugado (*Conjugated linoleic acid*)
CLNA	Ácido α-linolênico conjugado (*Conjugated linolenic acid*)
cm	Centímetro
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CT	Colesterol total
dL	Decilitro
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DPPH•	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTNB	5,5´ditiobis-2,2 ácido nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHB	Earle-HEPES-BSA
ER	Receptor de estrogênio

EROS	Espécies reativas ao oxigênio
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FRAP	Poder antioxidante de redução do ferro (*Ferric reducing antioxidant Power*)
G	Glicose
g	Gramas
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
h	Hora
H_2O	Água
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HCBD	Hexacloro-1,3-butadieno
HCl	Ácido clorídrico
HDL-C	Lipoproteína de alta densidade – Colesterol
HE	Hematoxilina-eosina
HEPES	*4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfónico*
HOMA-IR	Modelo de avaliação da homeostasia da insulina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High-performance Liquid Chromatography*)
IA	Índice de Acidez
IC_{50}	Capacidade de 50% de inibição
IFN	*Interferon*
IL	Interleucina
IP	Índice de Peróxido
I*p*A	Índice de *p*-anisidina
kcal	Quilocalorias
KCl	Cloreto de potássio
kg	Quilograma
KGy	Quilogray
KOH	Hidróxido de potássio
L	Litro
LA	Ácido linoléico (*Linoleic acid*)
LDL-C	Lipoproteína de baixa densidade – Colesterol
LNA	Ácido α-linolênico (*Linolenic acid*)
m	Metro
M	Molar
mEq	Miliequivalente
mg	Miligramas
mL	Mililitro

mm	Milímetro
mM	Milimolar
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MUFA	Ácido graxo monoinsaturado
N	Normalidade
n	Número
N_2	Gás nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
$NaOCH_3$	Métoxido de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-kB	*Factor nuclear kappa B*
nm	Nanômetros
nmol	Nanomolar
NOS	Óxido nítrico sintase
O_2	Gás oxigênio
O_2^-	Ânion superóxido
OL	Óleo de linhaça
OLETF	Ratos *otsuka long-evans tokushima fatty*
ORAC	Capacidade de Absorbância do Radical Oxigênio (*Oxygen radical absorbance capacity*)
P	Fósforo
p	Valor de probabilidade (p-valor)
PA	Ácido punícico (*Punicic acid*)
PAF	Fator de ativação de plaquetas
PC	Componente principal (*Principal component*)
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Período de indução
PL	Fosfolipídeo
PPARs	Receptores ativados por proliferador de peroxissomo
PSO	Óleo da semente de romã (*Pomegranate seed oil*)
PUFA	Ácido graxo poliinsaturado
qsp	Quantidade suficiente para
r	Coeficiente de correlação de Pearson
RBCM	Membranas das células vermelhas do sangue
RNA	Ácido ribonucleico
RORs	Receptor nuclear órfão
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	*Reverse-transcriptase polymerase chain reaction*
s	Segundos

SERM	Modulador do receptor de estrogênio seletivo
SOD	Superóxido dismutase
SS	Soma dos quadrados
t	*Trans*
TAB	Tecido adiposo branco
TAE	Tecido adiposo epididimal
TAR	Tecido adiposo retroperitonial
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS	Substância reativa ao ácido tiobarbitúrico
TEP	1,1',3,3'-Tetraetoxipropano
TG	Triglicerídeo
TK	*Trichosanthes kirilowii* Maxim.
TNF	Fator de necrose tumoral
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
U	Unidade
USA	Estados Unidos da América
USP	Universidade de São Paulo
WAT	Tecido adiposo branco
x	Vezes
α-ESA	Ácido α-eleosteárico
β-ESA	Ácido β-eleosteárico
Δ	Delta
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
µM	Micromolar
ω	Ômega
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
8-iso-PGF2α	8-iso-prostaglandina F2α

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO I

Figura I.1. A romã (punica granatum l.)..... 10

Figura I.2 Estrutura do ácido punícico e do ácido α-linolênico..... 14

Figura I.3 Biossíntese do ácido trienóico conjugado..... 18

Figura I.4. Via de conversão dos CLNAs (ácido punícico e ácido α-eleosteárico) para CLA (ácido linoléico conjugado)..... 20

CAPÍTULO II

Figura II.1 Cromatogramas correspondentes ao padrão de metil-ésteres (C4-C24) em diferentes condições cromatográficas: (a) CC 1, (b) CC 2 e (c) CC 3..... 50

Figura II.2 (a) Cinética de inibição da oxidação dos óleos de linhaça (OL), da semente de romã (PSO) e do BHT na concentração de 0,01% e (b) comparação do percentual de inibição da oxidação pelo sistema β-caroteno / ácido linoléico. One Way ANOVA (p<0,01)..... 57

Figura II.3 (a) Redução do radical DPPH• pelos óleos de linhaça (OL) e da semente de romã (PSO) e (b) comparação do efeito na redução do radical de 1mg dos óleos e do BHT. One Way ANOVA (p<0,01)..... 58

CAPÍTULO III

Figura III.1 Ganho de peso semanal dos animais suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias..... 79

Figura III.2 (a) Consumo médio diário (p<0,01) dos óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) e (b) consumo total de calorias durante 40 dias (b)..... 80

Figura III.3 (a) Porcentagem dos pesos do músculo gastrocnêmio, (b) tecido adiposo retroperitonial e (c) tecido adiposo epididimal em relação ao peso corpóreo total (% p/p) dos animais suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias..... 81

Figura III.4 (a) Teste Oral de Tolerância à Glicose e (b) Glicemia de jejum dos animais suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias..... 83

Figura III.5 Parâmetros bioquímicos plasmáticos: (a) triglicerídeos (p=0,04), (b) colesterol total (p<0,01) e (c) HDL-colesterol (p=0,01), dos animais suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias..... 85

Figura III.6 Parâmetros bioquímicos plasmáticos: (a) alanina aminotransferase e (b) aspartato aminotransferase, dos animais suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias. 87

Figura III.7 Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado: (a) grupo controle, (b) grupo suplementado com óleo de linhaça 2% e (c) grupo suplementado com óleo da semente de romã 2%. Seções transversais coradas com HE aumentadas 10x..... 101

Figura III.8 Valores referentes à (a) área e (b) diâmetro das fibras musculares, no músculo gastrocnêmio de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias..... 102

Figura III.9 Fotomicrografias de cortes histológicos de músculo (gastrocnêmio): (a) grupo controle, (b) grupo suplementado com óleo de linhaça 2% e (c) grupo suplementado com óleo da semente de romã 2%. Seções transversais coradas com HE aumentadas 20x (escala de 20 µm)..... 103

Figura III.10 Valores referentes ao (a) diâmetro (p<0,01) e (b) celularidade (p=0,01) dos adipócitos epididimais de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias..... 104

Figura III.11 Fotomicrografias dos adipócitos epididimais: (a) grupo controle, (b) grupo suplementado com óleo de linhaça 2% e (c) grupo suplementado com óleo da semente de romã 2%.. 104

Figura III.12 Efeito sobre a peroxidação lipídica, através da medida de TBARS, de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias: (a) soro, (b) fígado, (c) cérebro (p<0,01), (d) músculo gastrocnêmio, (e) coração e (f) rim..... 107

Figura III.13 Atividade das enzimas antioxidantes: (a) superóxido dismutase, (b) catalase e (c) glutationa peroxidase (p<0,01), em fígado de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias..... 110

Figura III.14 Atividade das enzimas antioxidantes: (a) superóxido dismutase, (b) catalase e (c) glutationa peroxidase (p=0,01), em cérebro de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias..... 111

Figura III.15 Atividade das enzimas antioxidantes: (a) superóxido dismutase (p<0,01), (b) catalase (p=0,04) e (c) glutationa peroxidase, no músculo gastrocnêmio de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias..... 112

Figura III.16 Atividade das enzimas antioxidantes: (a) superóxido dismutase (p<0,01), (b) catalase (p<0,01) e (c) glutationa peroxidase (p=0,03), no coração de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias..... 113

Figura III.17 Atividade das enzimas antioxidantes: (a) superóxido dismutase, (b) catalase (p=0,01) e (c) glutationa peroxidase, no rim de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias..... 114

Figura III.18 Análise por Componentes Principais (PC1 x PC2) para mostrar diferenças nos parâmetros avaliados entre os grupos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA)..... 117

Figura III.19 Análise Hierárquica de Agrupamentos para os grupos tratados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA)..... 118

Figura III.20 Análise por Componentes Principais (PC1 x PC2) para mostrar diferenças nos parâmetros avaliados entre os grupos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA)..... 119

Figura III.21 Análise Hierárquica de Agrupamentos para os grupos tratados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA)..... 119

CAPÍTULO IV

Figura IV.1 Transaminases: (a) alanina aminotransferase – AST (p<0,01) e (b) aspartato aminotransferase – ALT (p<0,01), em ratos suplementados com óleo da semente de romã (grupo CLNA) durante 21 dias e submetidos à injúria hepática com CCl_4..... 139

Figura IV.2 Conteúdo de lipídeos totais em fígado de ratos suplementados com óleo da semente de romã (grupo CLNA) durante 21 dias e submetidos à injúria hepática com CCl_4 (p=0,02)..... 140

Figura IV.3 Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado não tratado (Controle -) e tratado (Controle +) com CCl_4, mostrando as áreas de degeneração e necrose. Coloração: HE; aumento: 4x..... 142

Figura IV.4 Valores referentes a porcentagem de área lesada do fígado de ratos suplementados com óleo da semente de romã (grupo CLNA) durante 21 dias e submetidos à injúria hepática com CCl_4 (p<0,01)..... 142

Figura IV.5 Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado mostrando áreas de lesão. (a) grupo controle -, (b) grupo controle +, (c) grupo CLNA 2% e (d) grupo CLNA 4%. Coloração: HE; aumento: 4x; escala: 20µm..... 143

Figura IV.6 Efeito sobre a peroxidação lipídica, através da medida de TBARS: (a) soro (p=0,05) e (b) fígado (p<0,01), de ratos suplementados com óleo da semente de romã (grupo CLNA) durante 21 dias e submetidos à injúria hepática com CCl_4..... 144

Figura IV.7 Atividade das enzimas antioxidantes: (a) superóxido dismutase (p=0,02), (b) catalase (p=0,01), (c) glutationa peroxidase (p<0,01), (d) glutationa redutase (p=0,52) e (e) glutationa reduzida (p<0,01), em fígado de ratos suplementados com óleo da semente de romã (grupo CLNA) durante 21 dias e submetidos à injúria hepática com CCl_4..... 146

Figura IV.8 Expressão gênica das enzimas antioxidantes: (a) SOD e (b) CAT em fígado de ratos suplementados com óleo da semente de romã (grupo CLNA) durante 21 dias e submetidos à injúria hepática com CCl_4..... 148

Figura IV.9 Análise por Componentes Principais (PC1 x PC2) para mostrar diferenças nos parâmetros avaliados entre os grupos controles e suplementados com o óleo da semente de romã (grupo CLNA)..... 149

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO I

Tabela I.1 Composição de ácidos graxos (AGs) de óleos da semente de romã segundo alguns autores, resultados expressos em média ± desvio-padrão das porcentagens (%)..... 13

Tabela I.2 Isômeros majoritários do ácido α-linolênico conjugado em sementes de plantas 18

CAPÍTULO II

Tabela II.1 Perfil de ácidos graxos (%) presentes nos óleos de linhaça (OL) e da semente de romã (PSO), utilizando dois métodos de esterificação (mista e alcalina)..... 52

Tabela II.2 Composição de tocoferóis (mg/100g) dos óleos de linhaça (OL) e da semente de romã (PSO)..... 54

Tabela II.3 Composição de fitosteróis (mg/100g) dos óleos de linhaça (OL) e da semente de romã (PSO)..... 55

Tabela II.4 Características de qualidade e estabilidade dos óleos de linhaça (OL) e da semente de romã (PSO)..... 56

CAPÍTULO III

Tabela III.1 Perfil de ácidos graxos (AGs) presentes na ração comercial (Nuvilab CR-1) oferecida aos animais..... 78

Tabela III.2 Ingestão alimentar total, ganho de peso corpóreo e coeficiente de eficácia alimentar (CEA) de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias 79

Tabela III.3 Conteúdo de lipídeos totais em tecidos de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias 88

Tabela III.4 Perfil de ácidos graxos (AGs) no tecido hepático de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias..... 89

Tabela III.5 Perfil de ácidos graxos (AGs) no tecido cerebral de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias..... 90

Tabela III.6 Perfil de ácidos graxos (AGs) no músculo gastrocnêmio de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias..... 91

Tabela III.7 Perfil de ácidos graxos (AGs) no tecido cardíaco de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias..... 92

Tabela III.8 Perfil de ácidos graxos (AGs) no tecido renal de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias..... 93

Tabela III.9 Perfil de ácidos graxos (AGs) no tecido adiposo retroperitonial de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias..... 94

Tabela III.10 Perfil de ácidos graxos (AGs) no tecido adiposo epididimal de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias. 96

CAPÍTULO IV

Tabela IV.1 Perfil de ácidos graxos (AGs) no tecido hepático de ratos suplementados com óleo da semente de romã (grupo CLNA) durante 21 dias e submetidos à injúria hepática com CCl_4..... 141

INTRODUÇÃO GERAL

Ácidos graxos conjugados (AGCs) é o termo geral para descrever os isômeros posicionais e geométricos dos ácidos graxos poliinsaturados com duplas ligações conjugadas (CARVALHO; MELO; MANCINI-FILHO, 2010), as quais são separadas por uma ligação carbono-carbono simples em vez de serem separadas por um grupo metileno (CH_2) (HENNESSY et al., 2011). Teoricamente, vários isômeros dos AGCs são possíveis, com múltiplas combinações de configurações numéricas, posicionais e geométricas da conjugação de duplas ligações, podendo apresentarem-se como ácidos linoléicos conjugados (CLAs) e ácidos α-linolênicos conjugados (CLNAs) (YANG et al., 2009; NAGAO; YANAGITA, 2008).

Os AGCs do ácido linoléico (também chamados de CLAs, abreviação que vem do inglês *conjugated linoleic acids*) referem-se a um grupo de isômeros geométricos e de posição do ácido octadecadienóico que contêm duplas ligações em posição conjugada podendo apresentar configurações *cis* ou *trans* (BENJAMIN; SPENER, 2009). Existe um grande número de isômeros de CLAs relatados. Porém, devido suas funções biológicas, dois isômeros principais têm sido o foco das pesquisas correntes: 9*cis*,11*trans* e 10*trans*,12*cis*. O 9*c*,11*t* é o isômero predominante encontrado em fontes naturais, tais como carne, leite e produtos lácteos provenientes de animais ruminantes. A origem deste isômero dá-se a partir da biohidrogenação do ácido linoléico para ácido esteárico pelas bactérias ruminantes ou da desaturação (Δ9) do ácido vacênico (C18:1-11*t*) no tecido mamário. O outro isômero majoritário de CLA (10*t*,12*c*) está presente em baixíssimas concentrações nos alimentos, mas é primariamente originado de preparados sintéticos de CLAs. Atualmente, a maioria dos estudos com CLAs tem utilizado uma mistura destes dois isômeros (KIM; PARK, 2011; KENNEDY et al., 2010).

São muitas as investigações no sentido de avaliar os efeitos benéficos do consumo dos CLAs para a saúde. Estes têm sido considerados anticancerígenos, antiaterogênicos, antiadipogênicos, antidiabetogênicos e

antiinflamatórios dependendo das doses, isômeros e modelos utilizados (ALI et al., 2012; OBSEN et al., 2012).

Os AGCs do ácido α-linolênico (também chamados de CLNAs, abreviação de *conjugated linolenic acids*) referem-se a um grupo de isômeros geométricos e de posição do ácido octadecatrienóico que contém três duplas ligações em conjugação (SASSANO et al., 2009). Eles são encontrados exclusivamente em vários tipos de óleos de sementes vegetais, estando presente em elevadas quantidades (40 a 80% do total de ácidos graxos). Cada semente apresenta apenas uma enzima *conjugase* que converte ácido linoléico em um isômero específico de CLNAs (CARVALHO; MELO; MANCINI-FILHO, 2010). São cinco os isômeros de CLNAs mais conhecidos e que ocorrem como componentes de óleos de sementes de várias plantas importantes, tais como: o ácido α-eleosteárico (melão-de-são-caetano e tungue), ácido punícico (romã), ácido calêndico (calêndula), ácido jacárico (jacarandá) e ácido catálpico (catalpa da china) (MIRANDA et al., 2009; YUAN et al., 2009). As pesquisas têm mostrado que estes isômeros estão associados com propriedades anticarcinogênica, antiinflamatória e antiaterosclerótica, tanto *in vitro* como *in vivo*, e sua eficácia pode variar substancialmente entre os isômeros individuais. Assim, o processo de conjugação pode resultar na produção de uma série de ácidos graxos com diversos perfis biogênicos (HENNESSY et al., 2011).

O ácido punícico (chamado de PA, do inglês *punicic acid*), também conhecido como C18:3-9*c*,11*t*,13*c*, é um ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa (ω-5) que está presente em altas concentrações no óleo da semente de romã. Apesar de ser estruturalmente muito similar aos CLAs e ao ácido α-linolênico (LNA), o que aumenta o interesse nesses isômeros, não está certo se os CLNAs têm benefícios similares aqueles dos CLAs e/ou LNA (GROSSMANN et al., 2010).

Existem muitos estudos que avaliam os efeitos benéficos dos CLAs no organismo, especialmente em alguns modelos animais experimentais. No entanto, os resultados são controversos e algumas vezes mostram efeitos adversos. Além disso, os efeitos em seres humanos ainda são questionados e os mecanismos bioquímicos pelo qual os CLAs medeiam os potenciais efeitos à saúde, poderiam produzir alterações metabólicas indesejáveis (ANDREOLI et

al., 2009). Nesse sentido, a agência governamental brasileira ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) proibiu, através da resolução n° 833 de 28 de março de 2007, a comercialização em todo território nacional de suplementos contendo CLAs devido à falta de estudos científicos conclusivos relacionados à sua segurança e eficácia (BRASIL, 2007). Comparado aos CLAs, estudos sobre os efeitos fisiológicos dos CLNAs são ainda mais limitados (HENNESSY et al., 2011).

1 Justificativa

Os lipídeos da dieta constituem uma das principais prioridades na pesquisa, devido à associação destas com enfermidades cardíacas, obesidade, diabetes, câncer e outras (MCCLEMENTS; DECKER, 2008). Muitas funções das membranas celulares são dependentes da composição lipídica e os lipídeos ingeridos através da dieta podem modificar esta composição e a atividade bioquímica das mesmas (MANCINI-FILHO, 2010). Diante das evidências de que, não simplesmente a quantidade de gordura consumida, mas também o tipo de gordura (saturada, monoinsaturada e/ou poliinsaturada) e particularmente ácidos graxos específicos, são fatores importantes tanto na saúde humana como no desenvolvimento de doenças, torna-se pertinente a realização de mais pesquisas nesta área para elucidar os mecanismos de ação dos diferentes tipos de ácidos graxos sobre as células. Neste sentido, devido as recentes descobertas de suas propriedades químicas e fisiológicas, é crescente o interesse nos ácidos graxos conjugados bem como nas propriedades de seus isômeros.

O PA (C18:3-9*c*,11*t*,13*c*), encontrado em altas porcentagens no óleo da semente de romã, é um isômero posicional e geométrico do LNA (C18:3-9*c*,12*c*,15*c*). Comparado-o aos CLAs, estudos sobre os efeitos fisiológicos dos CLNAs ainda são limitados e, portanto, a obtenção de mais informações sobre a sua função no organismo animal é necessária. Além disso, o PA por sua característica em apresentar a estrutura conjugada das suas três duplas

ligações, sendo uma delas na posição *trans*, tem despertado o interesse em pesquisas visando a sua participação em processos fisiológicos.

2 Referências

ALI, Y.M.; KADIR, A.A.; AHMAD, Z.; YAAKUB, H.; ZAKARIA, Z.A.; ABDULLAH, M.N.H. Free radical scavenging activity of conjugated linoleic acid as single or mixed isomers. **Pharmaceutical Biology**, v.50, p.712-709, 2012.

ANDREOLI, M.F.; GONZALEZ, M.A.; MARTINELLI, M.I.; MOCCHIUTTI, N.O.; BERNAL, C.A. Effects of dietary conjugated linoleic acid at high-fat levels on triacylglycerol regulation in mice. **Nutrition**, v.25, p.445-452, 2009.

BENJAMIN, S.; SPENER, F. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. **Nutrition & Metabolism**, v.6, p.36-48, 2009.

BRASIL. Resolução Nº. 833, de 28 de março de 2007. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária resolve Determinar a apreensão, em todo território nacional, de todos os lotes do produto ácido linoléico conjugado - CLA, por não possuir registro no Ministério da Saúde. Acesso em: 14/03/10. http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=26272&mode=PRINT_VERSION

CARVALHO, E.B.T.; MELO, I.L.P.; MANCINI-FILHO, J. Chemical and physiological aspects of isomers of conjugated fatty acids. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, p.295-307, 2010.

GROSSMANN, M.E.; MIZUNO, N.K.; SCHUSTER, T.; CLEARY, M.P. Punicic acid is an ω-5 fatty acid capable if inhibiting breast cancer proliferation. **International Journal of Oncology**, v.36, p.421-426, 2010.

HENNESSY, A.A.; ROSS, R.P.; DEVERY, R.; STANTON, C. The health promoting properties of the conjugated isomers of α-linolenic acid. **Lipids**, v.40, p.105-119, 2011.

KENNEDY, A.; MARTINEZ, K.; SCHMIDT, S.; MANDRUP, S.; LAPOINTA, K.; MCINTOSHA, M. Antiobesity mechanisms of action of conjugated linoleic acid. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.21, p.171-179, 2010.

KIM, K.H.; PARK, Y. Food components with anti-obesity effect. T**he Annual Review of Food Science and Technology**, v.2. p.11.1-11.21, 2011.

MANCINI-FILHO, J. Alimentos funcionais nas doenças cardiovasculares. *In*: COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B. **Alimentos funcionais** – componentes bioativos e efeitos fisiológicos. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010. cap.18, p.297-305.

MCCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Lipids. *In*: DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Fennema's: Food Chemistry**, 4ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap.4, p.155-216.

MIRANDA, J.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; MACARULLA, M.T.; CHURRUCA, I.; GARCÍA, C.; RODRÍGUEZ, V.M.; SIMÓN, E.; PORTILHO, M.P. A comparison between CLNA and CLA effects on body fat, serum parameters and liver composition. **The Journal of Physiology and Biochemistry**, v.65, p.25-32, 2009.

NAGAO, K.; YANAGITA, T. Bioactive lipids in metabolic syndrome. **Progress in Lipid Research**, v.47, p.127-146, 2008.

OBSEN, T.; FAERGEMAN, N.J.; CHUNG, S.; MARLINEZ, K.; GOBERN, S.; LOREAU, O.; WABITSCH, M.; MANDRUP, S.; McINTOSH, M. *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid decreases *de novo* lipid synthesis in human adipocytes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.23, p.580-590, 2012.

SASSANO, G.; SANDERSON, P.; FRANX, J.; GROOT, P.; STRAALEN, J.V.; BASSAGANYA-RIERA, J. Analysis of pomegranate seed oil for the presence of jacaric acid. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.89, p.1046-1052, 2009.

YANG, L.; CAO, Y.; CHEN, J.N.; CHEN, Z.Y. Oxidative Stability of Conjugated Linolenic Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.4212-4217, 2009.

YUAN, G.F.; SINCLAIR, A.J.; SUN, H.Y.; Li, D. Fatty acid composition in tissues of mice fed diets containing conjugated linolenic acid and conjugated linoleic acid. **Journal of Food Lipids**, v.16, p.148-163, 2009.

CAPÍTULO I

ÓLEO DA SEMENTE DE ROMÃ (Punica granatum L.*): UMA FONTE DE ÁCIDO α-LINOLÊNICO CONJUGADO (ÁCIDO PUNÍCICO)*

RESUMO

O óleo da semente de romã apresenta um perfil de ácidos graxos característico, que inclui altas porcentagens do ácido punícico – um isômero conjugado do ácido α-linolênico. O termo ácido α-linolênico conjugado é coletivo e refere-se a um grupo de isômeros do ácido graxo octadecatrienóico (C18:3) comduplas ligações conjugadas.Recentemente, os ácidos graxos conjugados têm atraído grande atenção devido a relatos de seus benefícios para a saúde em uma variedade de modelos de doenças metabólicas e inflamatórias crônicas. Entretanto, alguns trabalhos apresentam resultados controversos e ainda não existe um consenso na literatura em relação aos seus efeitos em organismos animais e humanos.Este capítulo apresenta uma revisão bibliográfica sobre o óleo da semente de romã e os potenciais efeitos do ácido α-linolênico conjugado para a saúde.

Palavras chave: óleo da semente de romã, ácido punícico, ácido graxo conjugado.

1 INTRODUÇÃO

A romã (*Punica granatum* L.) é um fruto precioso com uma extensa literatura citando suas inúmeras propriedades funcionais (LANSKY; NEWMAN, 2007). A alta atividade antioxidante desta fruta, bem como do seu suco, tem sido a base para muitos dos supostos benefícios para a saúde, além de estimular pesquisas sobre o potencial nutracêutico e aplicações em alimentos (JOHANNINGSMEIER; HARRIS, 2011). A romã contém quantidades consideráveis de sementes, que muitas vezes permanecem como um produto de resíduos após o processamento, podendo ser utilizada para a produção de óleo com composição nutricional interessante (KÝRALAN; GÖLÜKCÜ; TOKGÖZ, 2009).

Segundo Johanningsmeier e Harris (2011), o óleo da semente de romã tem alto conteúdo de fitosteróis e um perfil de ácidos graxos característico, que inclui altas porcentagens (70-76%) do ácido punícico – um isômero conjugado do ácido α-linolênico (CLNA). O ácido punícico é um ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa ω-5 e estruturalmente, pela composição de átomos de carbono, disposição e número das duplas ligações, similar ao ácido linoléico conjugado (CLA) e ácido α-linolênico (LNA). Estes têm sido considerados como possuidores de vários benefícios para a saúde (GROSSMANN et al., 2010). O interesse nos efeitos dos ácidos graxos conjugados para a saúde está aumentando uma vez que eles têm sido considerados como antioxidantes, antitumorais, imunomoduladores, antiaterosclerótico e redutores de lipídeos séricos (CARVALHO; MELO; MANCINI-FILHO, 2010).

Este capítulo apresenta uma revisão bibliográfica sobre o óleo da semente de romã e os potenciais efeitos do ácido α-linolênico conjugado para a saúde.

2 A ROMÃ

A romã é uma fruta ancestral, que tem sido mundialmente consumida em várias culturas por milhares de anos. O uso desta fruta remonta aos tempos bíblicos e relatos de sua qualidade terapêutica tem ecoado por todo o milênio. Os babilônios consideravam as sementes da romã como um agente de ressureição; os persas acreditavam que as sementes conferiam invencibilidade em campos de batalha; enquanto que para os chineses antigos as sementes simbolizavam longevidade e imortalidade (VIUDA-MARTOS; FERNÁNDEZ-LÓPEZ; PÉREZ-ÁLVAREZ, 2010).

A romã (*Punica granatum* L.), pertencente à família *Punicacea*, é um dos mais antigos frutos comestíveis. É cultivada em países mediterrânicos (Índia e Irã) e, em certa medida, nos EUA, China, Japão e Rússia. As partes comestíveis deste fruto (cerca de 55 a 60% do peso total do fruto, consistindo de 75 a 85% suco e 15 a 25% sementes) são consumidos principalmente na forma fresca, no entanto, na indústria de alimentos podem ser utilizadas para produzir suco de frutas, vinhos, licores, geléia e enlatados (MODARESI et al., 2011; KÝRALAN; GÖLÜKCÜ; TOKGÖZ, 2009). Em adição, a romã é mundialmente usada em fórmulas terapêuticas, cosméticos e temperos para alimentos (VIUDA-MARTOS; FERNÁNDEZ-LÓPEZ; PÉREZ-ÁLVAREZ, 2010). De acordo com Miguel, Neves e Antunes (2010), a parte comestível da romã contém açúcares, vitaminas, polissacarídeos, polifenóis e minerais, embora, vários fatores possam contribuir para a composição química, incluindo cultivares, condições ambientais, amadurecimento, tratamento pós-colheita e estocagem, os quais podem afetar a qualidade da fruta e os componentes benéficos para a saúde.

Além disso, essa fruta tem sido utilizada há séculos para o tratamento de várias doenças e muitos estudos têm sido conduzidos para avaliar a eficácia da romã dotada de uma elevada atividade antioxidante como um agente antiproliferativo, antiinvasivo e pró apoptótico em várias linhas celulares de câncer e de modelos animais (SYED; AFAQ; MUKHTAR, 2007). Mais de 50 compostos com atividades fitoestrogênica e antioxidante foram isolados de

sementes de romã, suco, cascas, folhas e flores. As cascas secas de frutos maduros são utilizadas para tratar a dor de estômago e foram efetivas na prevenção da lipoperoxidação; extratos de fruta têm sido mostrados serem eficazes contra o vírus da herpes e da influenza, além de resultar na supressão da proliferação de células humanas cancerosas da mama e da próstata; a combinação de concentrado do suco e do extrato de sementes da romã tem sido demonstrado para melhorar o desgaste ósseo e a depressão experimental em ratos ovariectomizados (JOHANNINGSMEIER; HARRIS, 2011; TRAN et al., 2010). Atividades antiinflamatória, antimicrobial e imunosupressiva, efeito protetor da função hepática e no metabolismo da glicose e lipídeos também foram relatados entre outras propriedades biológicas (MIGUEL; NEVES; ANTUNES, 2010).

O fruto da romã pode ser dividido em três partes (Figura I.1): as sementes (~3% do peso da fruta), contendo cerca de 20% de óleo; o suco (~30% do peso da fruta) e as cascas (pericárpio) que também incluem a rede interior das membranas (LANSKY; NEWMAN, 2007).

Figura I.1. A romã (*Punica granatum* L.).

Frequentemente, as sementes de romã permanecem como um subproduto após o processamento. Segundo Kýralan, Gölükcü e Tokgöz (2009), a romã contém quantidades consideráveis de sementes, que variam

entre 40 e 100 gramas por kilo de peso do fruto de acordo com a cultivar; e são ricas em açúcares, ácidos graxos poliinsaturados, vitaminas, polissacarídeos, polifenóis e minerais e têm alta atividade antioxidante (SYED; AFAQ; MUKHTAR, 2007). De acordo com Jardini e Mancini-Filho (2007), as sementes de romã, provenientes da cidade de Petrolina, apresentaram maior teor de hidratos de carbono (43,97%), seguido pelo valor de umidade (38,30%) e um expressivo teor de lípideos (14,06%). Considerando a quantidade de semente que é produzida, o teor de óleo e sua composição podem ser de grande interesse na utilização tanto como alimento quanto nutracêutico.

2.1 Óleo da semente de romã

O óleo da semente de romã (chamado de PSO, abreviação de *pomegranate seed oil*) apresenta várias características que o torna um ingrediente nutracêutico atrativo como uma consequência de sua novidade, boa aceitação pelos consumidores, disponível a baixo custo e composição fitoquímica promissora (CALIGIANI et al., 2010).

O PSO compreende 12 a 20% do peso total da semente e consiste em aproximadamente 80% de ácido graxo octadecatrienóico conjugado, com um alto conteúdo do C18:3-9*cis*,11*trans*,13*cis* (ácido punícico), sintetizado *in situ* a partir do ácido graxo octadecadienóico não conjugado (ácido linoléico), presente em cerca de 7% do PSO (LANSKY; NEWMAN, 2007). Em adição ao ácido punícico, o PSO também contém quantidades menores de outros isômeros de CLNAs incluindo ácido α-eleosteárico (9*c*,11*t*,13*t*) e ácido catálpico (9*t*,11*t*,13*c*) (VROEGRIJK et al., 2011). No entanto, o teor de óleo e a composição de ácidos graxos de óleos vegetais variam dependendo do genótipo, localização, época de colheita e das condições climáticas, entre outros fatores (KÝRALAN; GÖLÜKCÜ; TOKGÖZ, 2009). De acordo com Yuan et al. (2009[d]), a análise de cromatografia de camada delgada do óleo da semente de romã mostrou que os lipídeos totais foram compostos principalmente de triglicerídeos (TG) e, segundo Lansky e Newman (2007), os ácidos graxos do PSO compreende mais de 95% do óleo, do qual 99% está na

forma de TG. A composição de TGs presentes no PSO parece ser variável, sendo CLNA-CLNA-CLNA e CLNA-CLNA-P as mais importantes (ELFALLEH et al., 2011).

Lansky e Newman (2007) relatam a presença de componentes menores no PSO, incluindo esteróis, esteróides e um componente chave da bainha de mielina dos mamíferos, o cerebrosídeo. Segundo Elfalleh et al. (2011), o PSO apresenta altas concentrações de fitosteróis (4,1 a 6,2 mg/kg), sendo o β-sitosterol, campesterol e estigmasterol os principais encontrados, e de tocoferóis, sendo o α-tocoferol (161-170 mg/100g) e o γ-tocoferol (80-93 mg/100g) os majoritários.

A Tabela I.1 mostra o perfil lipídico do óleo da semente de romã, de acordo com alguns autores. A composição de ácidos graxos é expressa em porcentagem de cada ácido graxo em relação à soma do total dos mesmos.

Tabela I.1. Composição de ácidos graxos (AGs) de óleos da semente de romã segundo alguns autores, resultados expressos em média ± desvio-padrão das porcentagens (%).

AGs	Referência (número de cultivares analisado)				
	1 (21)	2 (25)	3 (15)	4 (6)	5 (1)
14:0	0,18 ± 0,21	0,7 ± 1,5		0,35 ± 0,10	
16:0	5,07 ± 1,30	5,7 ± 4,1	2,45 ± 0,19	4,00 ± 0,76	4,04 ± 0,34
18:0	4,20 ± 1,56	2,1 ± 3,1	1,52 ± 0,26	2,92 ± 0,56	2,30 ± 0,21
18:1 (ω-9)	7,86 ± 2,25	9,0 ± 5,6	4,19 ± 0,61	5,68 ± 1,69	5,29 ± 0,25
18:2 (ω-6)	8,36 ± 2,36	10,8 ± 6,9	4,49 ± 0,49	4,08 ± 1,04	6,05 ± 0,53
18:3 (9*c*11*t*13*t*)	10,70 ± 4,44		6,41 ± 0,27		
18:3 (9*t*11*t*13*t*)	8,78 ± 5,16		1,03 ± 0,16		
18:3 (9*t*11*t*13*c*)	15,24 ± 6,17		3,48 ± 0,34		
18:3 (9*c*11*t*13*c*)	36,98 ± 10,12	71,5 ± 17,9	74,11 ± 1,55	81,22 ± 2,15	58,14 ± 2,10
20:0	0,69 ± 0,14		0,39 ± 0,04	0,53 ± 0,18	0,50 ± 0,04
20:1	1,65 ± 1,85		0,61 ± 0,09		0,61 ± 0,05
22:0		0,1	0,18 ± 0,02		
24:0	0,97 ± 0,94			1,00 ± 0,24	

1 (ELEFALLEH et al., 2010 - China e Tunísia); 2 (PARASHAR; SINHA; SINGH, 2010 - India); 3 (KÝRALAN; GÖLÜKCÜ; TOKGÖZ, 2009 - Turquia); 4 (PANDE; AKOH, 2009 - Georgia); 5 (JARDINI; MANCINI-FILHO, 2007 - Petrolina, Brasil – 23,05% de AGs não identificados).

A composição química única do PSO tem estimulado pesquisas específicas dos efeitos saudáveis do óleo, incluindo controle de peso, reparo da pele e alteração dos lipídeos sanguíneos em indivíduos hiperlipidêmicos (JOHANNINGSMEIER; HARRIS, 2011). Segundo Koba et al. (2007[a]), a romã contém ácido punícico como o ácido graxo principal dos lipídeos presentes em sua semente e, portanto, o óleo da semente desta fruta é fonte adequada para investigar as funções fisiológicas deste isômero do CLNA.

2.1.1 Ácido punícico

O ácido punícico (chamado de PA, do inglês *punicic acid*) é um isômero posicional e geométrico do ácido α-linolênico (LNA; C18:3-9*c*,12*c*,15*c*), cuja estrutura é C18:3-9*c*,11*t*,13*c* (YUAN et al., 2009[be]), como pode ser observada na Figura I.2. Teoricamente, o PA apresenta 66% de duplas ligações na configuração *cis* e 33% na configuração *trans* (SAHA; GHOSH, 2009). De acordo com Grossmann et al. (2010), o PA é um ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa ω-5 e estruturalmente similar ao CLA e LNA, os quais têm sido considerados como possuidores de vários benefícios para a saúde. Neste sentido, tem sido alvo de pesquisas que avaliam o efeito dos CLNAs tanto *in vitro* como *in vivo*.

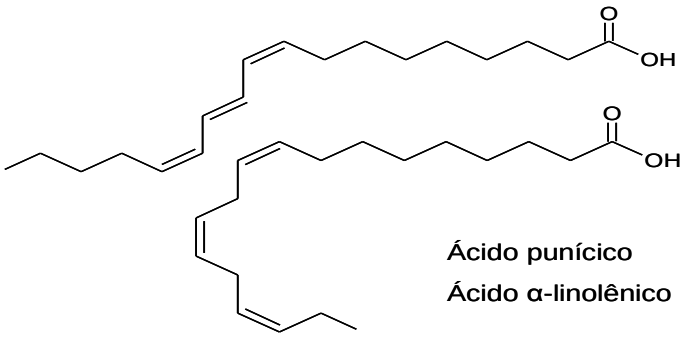


Figura I.2. Estrutura do ácido punícico e do ácido α-linolênico.

2.2 Efeitos do PSO na saúde

Embora o interesse na romã concentre-se em grande parte nas propriedades antioxidante e antiinflamatórias do suco, tem sido demonstrado que o PSO promove a reparação da pele, em particular a regeneração da epiderme (SASSANO et al., 2009). Neste sentido, o PSO tem atraído considerável atenção devido aos seus efeitos biológicos potencialmente benéficos, uma vez que também pode melhorar a função imunológica *in vivo*, reduzir o acúmulo de triglicerídeos hepáticos e atuar como agente

quimiopreventivo contra cânceres humanos hormônio relacionados (próstata e mama) e de cólon (CALIGIANI et al., 2010). Devido a sua semelhança com CLAs e LNA, os estudos que avaliam o efeito do PSO, devido à presença de altas porcentagens do PA, estão sendo focados principalmente no efeito de redução da massa corpórea e dos lipídeos séricos. Entretanto, os trabalhos ainda apresentam resultados controversos.

Um estudo que avaliou o efeito do consumo de diferentes tipos de óleos de sementes sobre o peso corporal de ratos mostrou que os animais alimentados com o PSO, mas não os óleos da semente de outras plantas (melão-de-são-caetano, catalpa da china, calêndula), exibiram uma significante redução no peso do tecido adiposo perirenal em comparação com o grupo controle (alimentado com óleo de linhaça rico em ácido α-linolênico) (KOBA; BELURY; SUGANO, 2007). Em outro trabalho, o PSO promoveu diminuição dose dependente do tecido adiposo epididimal e perirenal de ratos alimentados com 0, 0,25 ou 0,50% de ácido punícico na dieta basal contendo 10% de óleo de colza, confirmando que o PA poderia ser pelo menos um dos fatores responsáveis pela redução no peso do tecido adiposo (KOBA et al., 2007). No entanto, Yuan et al. (2009[d]) não observaram diferenças nos pesos desses tecidos adiposos em camundongos alimentados com PSO.

Dieta contendo PSO (rica em PA) atenua o acúmulo de triglicerídeos no fígado em ratos obesos e hiperlipidêmicos (ARAO et al., 2004[b]). Yamasaki et al. (2006) ao avaliarem as concentrações de triglicerídeos (TG), colesterol total (CT) e fosfolipídeos (PL) no soro de ratos alimentados com PSO, observaram aumento desses marcadores no soro de maneira dose dependente quando comparados ao grupo controle. Embora não tenha sido detectada diferença estatística nas concentrações de CT entre os grupos, os valores de TG e PL no grupo experimental foram significativamente diferentes do grupo controle. Já Yuan et al. (2009[d]) observaram uma redução significativa nas concentrações de TG no fígado de camundongos alimentados com o PSO em comparação aos grupos controle e o que recebeu CLA. Entretanto, não observaram diferenças nas concentrações de CT e PL entre os grupos estudados.

Estudos com humanos ainda são escassos e também controversos. Recentemente, Mirmiran et al. (2010) concluíram que o consumo de PSO durante quatro semanas por adultos hiperlipidêmicos não alterau a composição corporal e os níveis de colesterol e da fração lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), mas reduziu a concentração de triglicerídeos séricos. Entretanto, Yuan et al. (2009[be]) não observaram efeito significante nos lipídeos séricos em humanos saudáveis suplementados com sementes de *Trichosanthes kirilowii*, fonte natural de ácido punícico.

Outros achados mostram que a suplementação com PSO durante 14 semanas em camundongos CD-1 machos (tipo selvagem e isentos de agentes patogênicos) alimentados com dieta hiperlipídica resultou na redução do ganho de peso total, da leptina e da insulina, atuando como um redutor potencial do risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2 (McFARLIN; STROHACKER; KUEHT, 2009). Em concordância com este achado, Hontecillas et al. (2009) encontraram que o PSO melhora a tolerância à glicose e suprime o quadro de inflamação relacionado à obesidade. Ainda nessa linha, Vroegrijk et al. (2011) relataram que a suplementação com o PSO não afetou a sensibilidade à insulina no fígado, mas melhorou a sensibilidade à insulina periférica em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Esses autores mostraram ainda evidências de que o PSO aumenta a capacidade oxidativa de carboidratos, concluindo que a suplementação com PSO melhora a resistência a insulina e obesidade induzida pela dieta.

Além disso, o PSO apresenta efeitos antioxidante e antiinflamatório *in vivo*, limitando a ativação de neutrófilos e as consequências de peroxidação lipídica; podendo, portanto, ser utilizado na redução do risco de várias doenças inflamatórias, tais como doença inflamatória do intestino, artrite reumatóide e doença cardíaca coronária (BOUSSETTA et al., 2009). Bouroshaki et al. (2010) concluíram que o PSO atenua a nefrotoxicidade induzida por HCBD (hexacloro-1,3-butadieno) em ratos, por melhorar a função renal e diminuir dano nas proteínas e lipídeos, mas explicações e os mecanismos de proteção necessitam de mais estudos.

3 ÁCIDO α-LINOLÊNICO CONJUGADO

Após a descoberta dos CLAs na década de 1980 e dos avanços nas pesquisas relacionadas ao seu efeito citotóxico em células cancerígenas bem como outros efeitos na saúde, como redução da gordura corpórea e alterações no metabolismo dos lipídeos; mais recentemente, na década de 2000, os efeitos citotóxicos e antitumorais de outros ácidos graxos com duplas ligações conjugadas, os CLNAs, passaram a ser alvo de estudos neste contexto (NAGAO; YANAGITA, 2005).

O termo ácido α-linolênico conjugado (CLNA) é coletivo e refere-se a um grupo de isômeros do ácido graxo octadecatrienóico (C18:3) com duplas ligações conjugadas. As três duplas ligações presentes nos CLNAs estão principalmente nas posições [9, 11, 13] e [8, 10, 12] e existem em ambas as formas *cis* e *trans* (KÝRALAN; GÖLÜKCÜ; TOKGÖZ, 2009; SASSANO et al., 2009).

3.1 Fonte, biossíntese e isômeros dos CLNAs

Os CLNAs são encontrados em lipídeos vegetais, especialmente em vários tipos de óleos de sementes vegetais (KINAMI et al., 2007), estando presentes em elevadas quantidades, representando 40 a 80% do total de ácidos graxos (HENNESSY et al., 2011; YANG et al., 2005). São cinco os isômeros de CLNAs mais conhecidos e que ocorrem como componentes de óleos de sementes de várias plantas importantes (Tabela I.2), tais como: o ácido α-eleosteárico (α-ESA), ácido punícico (PA), ácido calêndico, ácido jacárico e ácido catálpico (YUAN et al., 2009[b,e]). Porém, Sassano et al. (2009) acrescenta ainda os ácidos β-eleosteárico (β-ESA; C18:3-9*t*,11*t*,13*t*) e β-calêndico (C18:3-8*t*,10*t*,12*t*) aos mencionados acima, afirmando que são sete os isômeros de CLNAs comumente conhecidos.

Entre as sementes que contêm CLNAs, somente aquelas do *Trichosanthes kirilowii* Maxim. (TK) da China são comestíveis. As sementes de

TK são um alimento popular na China e contêm ácido punícico em cerca de 30% a 40% (MUKHERJEE et al., 2002; YUAN et al., 2009[abf]).

Tabela I.2. Isômeros majoritários do ácido α-linolênico conjugado em sementes de plantas.

Vegetal	Ácido graxo	Conformação isomérica	% presente no óleo
Tungue (*Aleutrites fordii*)	α-eleosteárico	9*cis*,11*trans*,13*trans*	70%
Melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia*)	α-eleosteárico	9*cis*,11*trans*,13*trans*	60%
Romã (*Punica granatum*)	Punícico	9*cis*,11*trans*,13*cis*	72%
Catalpa da China (*Catalpa ovata*)	Catálpico	9*trans*,11*trans*,13*cis*	31%
Calêndula (*Calendula officinalis*)	Calêndico	8*trans*,10*trans*,12*cis*	33%
Jacarandá (*Jacarandá* sp)	Jacárico	8*cis*,10*trans*,12*cis*	32%

MIRANDA et al. (2009); NAGAO; YANAGITA (2008); KOBA et al. (2007).

Esses isômeros específicos são encontrados em sementes de plantas selecionadas, frequentemente como principais ácidos graxos. Cada semente apresenta apenas uma enzima *conjugase* que converte o ácido linoléico em um isômero específico de CLNAs (Figura I.3) (HENNESSY et al., 2011; KOBA et al., 2007).

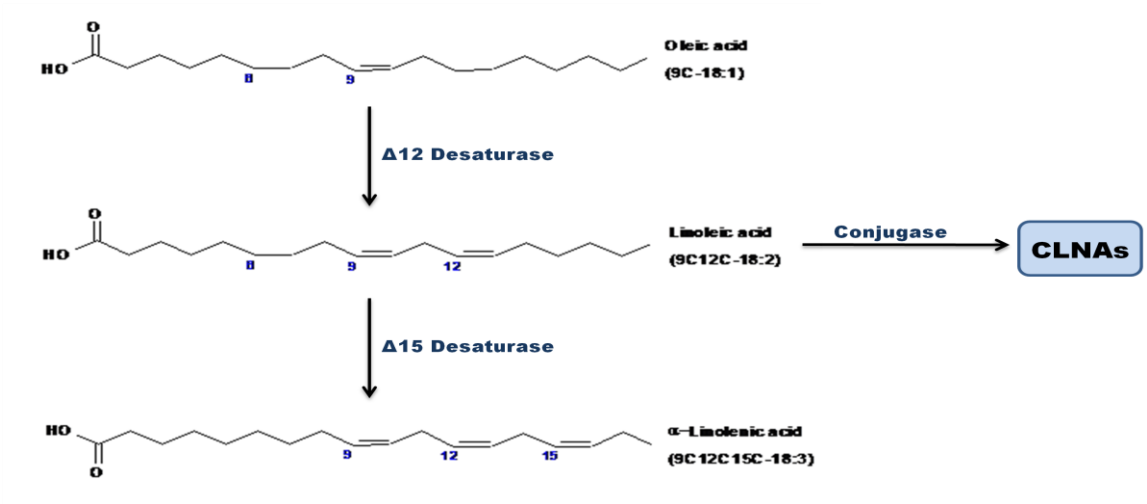


Figura I.3. Biossíntese do ácido trienóico conjugado.
[Figura adaptada de Hennessy et al. (2011) e Koba, Belury e Sugano (2007)]

Os CLNAs também podem ser formados durante o processamento de óleos vegetais, como resultado da isomerização e desidratação de produtos de oxidação secundários dos ácidos linoléico e α-linolênico (KINAMI et al., 2007; CAO et al., 2009). Embora a isomerização alcalina seja eficaz para a produção de CLNAs em massa, a identificação dos perfis detalhados dos CLNAs sintéticos é difícil, pois a mistura resultante é composta de muitos isômeros de CLNAs diferentes. No entanto, tem sido mostrado que os CLNAs sintéticos exercem funções fisiológicas importantes, tais como efeitos anticarcinogênico e antiobesidade (KOBA; BELURY; SUGANO, 2007). Além disso, Coakley et al. (2009) demonstraram que cinco cepas de bifidobactérias de origem intestinal humana converteram o LNA em CLNAs e especularam que a capacidade das bifidobactérias provenientes do intestino humano para biossintetizar lipídeos biologicamente ativos, tais como 9*c*,11*t*-CLA e CLNAs pode estar relacionada à seus eventuais efeitos terapêuticos.

3.2 Metabolismo e incorporação dos CLNAs

O estudo realizado por Plourde et al. (2006) demonstrou que uma mistura equimolar de dois isômeros de CLNAs (C18:3-9*c*,11*t*,15*c* e C18:3-9*c*,13*t*,15*c*) obteve a mesma eficiência de absorção aparente que o C18:2-9*c*,11*t* quando ingerido sob condições nutricionais e fisiológicas. Ambos os isômeros do CLNA foram incorporados, principalmente nos lipídeos neutros, mas eles não foram metabolizados à CLAs. Esses isômeros foram metabolizados via alongamento / dessaturação, semelhante ao LNA, com o isômero C18:3-9*c*,11*t*,15*c* sendo convertido em C22:6 ω-3 conjugado e o isômero C18:3-9*c*,13*t*,15*c* sendo convertido em C20:5 ω-3 conjugado. Yuan et al. (2009[c]) relataram que a proporção de C22:6 ω-3 foi significativamente aumentada nos fosfolipídios do fígado de camundongos suplementados com 1% de PA, mas não com α-ESA, durante seis semanas. Este resultado foi consistente com o estudo de Koba, Belury e Sugano (2007), o qual mostrou que a alimentação com 0,5% de óleo de semente de romã, contendo PA, aumentou a proporção de C22:6 ω-3 no fígado de ratos. Enquanto, Noguchi et al. (2001) observaram anteriormente que a suplementação com óleo da

semente de Melão-de-São-Caetano contendo α-ESA por quatro semanas aumentou a proporção de C22:6 ω-3 no fígado de ratos.

No entanto, alguns estudos demonstram que os CLNAs são bem absorvidos pelo organismo e são metabolizados à CLA *in vivo* (TSUZUKI et al., 2006; KOBA; BELURY; SUGANO, 2007; YUAN et al., 2009[f]). Estes achados têm levado a um aumento no interesse da utilização de CLNAs. Esses autores também especulam que CLNAs podem ser convertidos em CLA por uma reação de Δ13-saturação realizada por uma enzima dependente de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) que é capaz de reconhecer o ácido trienóico conjugado ou a enzima ativa na via redutora do leucotrieno B4. A Figura I.4 mostra o mecanismo proposto do metabolismo de CLNAs para CLA.

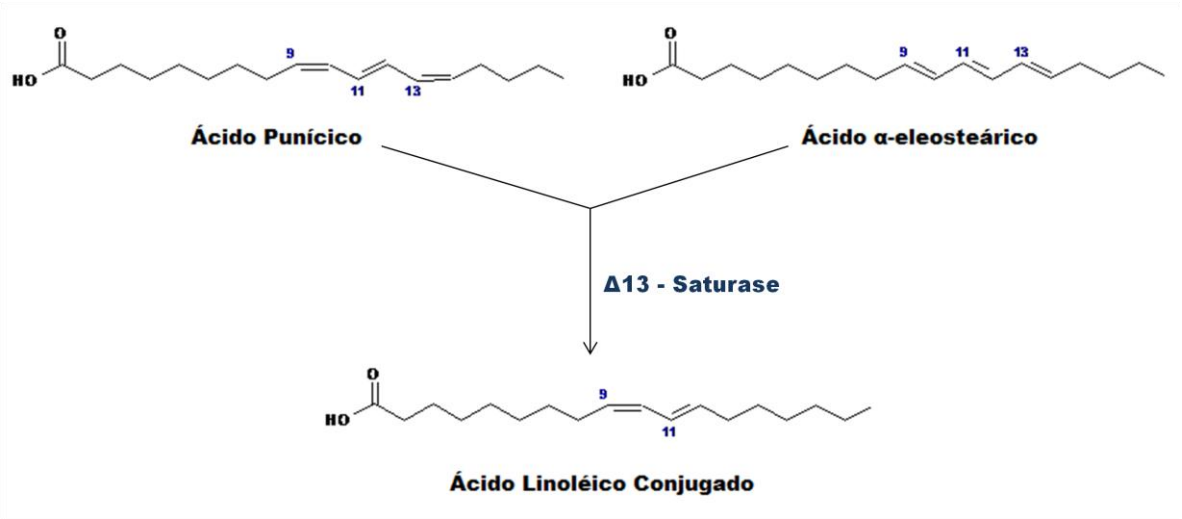


Figura I.4. Via de conversão dos CLNAs (ácido punícico e ácido α-eleosteárico) para CLA (ácido linoléico conjugado).
[Figura adaptada de Nemer (2009)]

Tsuzuki et al. (2006) investigaram a absorção e metabolismo dos CLNAs (α-ESA e PA) no intestino de ratos utilizando um ensaio de absorção de lipídeos na linfa do ducto torácico. Os resultados indicaram que o α-ESA e o PA são lentamente absorvidos em um estado inalterado no intestino de ratos e uma parte desses ácidos graxos é rapidamente convertida em CLA. Resultados semelhantes foram encontrados por Yuan et al. (2009[f]), que mostraram a

rápida conversão do PA a 9*c*,11*t*-CLA no plasma e em diferentes tecidos de ratos. Além disso, não foram detectados CLA e PA imediatamente após o tratamento (tempo zero), mas ambos foram detectadas nos tecidos e plasma de ratos nas 4, 8, 12 e 24 horas após o tratamento (cada rato foi alimentado com cerca de 645 mg de PA). As quantidades de PA e de CLA no fígado e no plasma dos animais foram maiores do que no cérebro, coração, rim e tecido adiposo.

Yuan et al. (2009[ac]) demonstraram ainda que o acúmulo de PA nos tecidos examinados foi significativamente superior ao do α-ESA e constatou que a taxa de conversão relativa do α-ESA em 9*c*,11*t*-CLA foi significativamente maior do que a do PA nos fosfolipídeos e triglicerídeos do fígado, fornecendo evidências adicionais de que o α-ESA é mais eficientemente saturado na Δ13 dupla ligação do que o PA. A maior taxa de conversão do α-ESA foi encontrada no tecido adiposo (91,8%), baço (91,4%) e rim (90,7%), e a menor foi no coração (84,6%). A maior taxa de conversão do PA ocorreu no fígado (76,2%) e a menor também no coração (54,5%) (YUAN et al., 2009[d]). A única diferença entre o α-ESA e o PA é a estrutura geométrica da ligação dupla na posição 13, uma vez que no α-ESA é uma ligação dupla *trans* enquanto que no PA é uma ligação dupla *cis*. Portanto, é possível que a estrutura geométrica da Δ13 dupla ligação afete a atividade de saturação da enzima, e a diferença nas taxas de conversão do α-ESA e do PA *in vivo* foi devido ao efeito substrato específico dessa enzima. É especulado que o fígado poderia ser a fonte das enzimas responsáveis pela conversão dos CLNAs em CLA (YUAN et al., 2009[ef]). Estes resultados indicam que os isômeros de CLNAs são metabolizados e incorporados discriminadamente. Entretanto, estudos adicionais são necessários e importantes para fornecer uma melhor compreensão deste mecanismo de metabolismo dos CLNAs.

Cao et al. (2009) relataram que a incorporação de três diferentes isômeros do CLNA para o leite em ratas foi seletiva. Uma mistura de isômeros do CLNA, incluindo C18:3-9*c*,11*t*,13*t*; C18:3-9*t*,11*t*,13*t* e C18:3-9*c*,11*t*,13*c*, foi adicionada à dieta materna e os resultados mostraram que o isômero 9*c*,11*t*,13*c*-CLNA (uma ligação *trans*) foi o mais incorporado no leite, seguido por 9*c*,11*t*,13*t*-CLNA (duas duplas ligações *trans*) e 9*t*,11*t*,13*t*-CLNA (três

duplas ligações *trans*) em ordem decrescente. Outra observação interessante foi que o leite das ratas que consumiram uma dieta contendo CLNAs continha CLAs, indicando que os CLNAs são convertidos a CLAs. Estes resultados sugerem que a oxidorredutase de saturação da Δ13 tem preferência por substratos com uma configuração *trans*.

Existem poucos dados na literatura sobre a incorporação e metabolismo dos CLNAs em seres humanos. Yuan et al. (2009[e]) investigaram a incorporação e metabolismo do PA em pessoas jovens saudáveis (n=15). Após o consumo diário durante 28 dias de sementes de TK, contendo três gramas de PA, a proporção de PA aumentou em 0,47% no plasma e 0,37% nas membranas das células vermelhas do sangue (RBCM). Além disso, a proporção de C18:2-9*c*,11*t* aumentou de 0,05 para 0,23% no plasma e de 0,03 para 0,17% nas RBCM. Os resultados sugerem que o PA pode ser efetivamente incorporado no plasma e nas RBCM de humanos e também está associado com o aumento de 9*c*,11*t*-CLA em seres humanos, presumivelmente, como resultado do metabolismo de uma reação de saturação.

A observação de que CLNAs poderiam ser convertidos em 9*c*,11*t*-CLA tem ganhodo uma importância crescente uma vez que tem sido demonstrado que o 9*c*,11*t*-CLA pode exercer muitas atividades biológicas benéficas. Tendo em vista que os CLNAs (α-ESA e PA) estão presentes em algumas sementes de plantas em grandes quantidades, tais como *Trichosanthes kirilowii* (TK), romã e melão amargo, eles poderiam ser purificados com uma relativa facilidade e serem fontes alternativas para obtenção dos efeitos sobre a saúde provenientes dos CLAs (YUAN et al., 2009[ef]). Além disso, esses componentes naturais que contêm CLNAs poderiam ser uma fonte dietética potencial de CLAs e se espera que sejam úteis como um alimento funcional e/ou nutracêutico. Neste sentido, o impacto biológico da ingestão desses ácidos graxos deve ser considerado, uma vez que poderia interferir com o metabolismo lipídico e exercer outros efeitos na saúde.

3.3 Efeitos dos CLNAs no organismo

Recentemente, os ácidos graxos conjugados têm atraído significativa atenção devida seus benefícios para a saúde em uma variedade de modelos de doenças metabólicas e inflamatórias crônicas (VROEGRIJK et al., 2011).

Embora as informações ainda sejam limitadas e não permitam um consenso em relação aos efeitos dos CLNAs em organismos animais e humanos, alguns estudos demonstraram que CLNAs têm um efeito citotóxico em cultura de células tumorais humanas (GROSSMANN et al., 2010; IGARASHI; MIYAZAWA, 2005; YASUI et al., 2005), inibe a carcinogênese (TSUZUKI; KAWAKAMI, 2008; KOHNO et al., 2004; TSUZUKI et al., 2004) e altera o metabolismo lipídico em animais (LAM et al., 2008; KOBA; BELURY; SUGANO, 2007; YAMASAKI et al., 2006; YANG et al., 2005). Alguns autores acreditam que um possível mecanismo dos efeitos antitumorais dos CLNAs é pela indução da apoptose celular através da lipoperoxidação e da via da proteína C quinase (GROSSMANN et al., 2010; TSUZUKI et al., 2004; IGARASHI; MIYAZAWA, 2000).

Foi constatado também que diferentes isômeros de CLNAs exercem diferentes atividades biológicas (SUZUKI et al., 2001), mas seus mecanismos de ação ainda não estão claros. Além disso, estudos têm mostrado que CLNAs podem ser metabolizados a CLAs *in vivo*, sugerindo que os benefícios à saúde dos CLNAs, possam ser devido à formação de CLAs. Alguns dos potenciais efeitos dos CLNAs são relatados a seguir.

3.3.1 Composição corporal, perfil lipídico e metabolismo da glicose

As pesquisas realizadas até o momento apontam resultados controversos sobre o papel dos CLNAs no ganho de peso, composição corporal, lipídeos no soro e no metabolismo da glicose e índice de resistência à insulina.

Koba et al. (2002) investigaram como os CLNAs afetam a massa de gordura corporal em ratos e concluíram que a alimentação com CLNAs resultou em redução no peso do tecido adiposo. Em contraste, a suplementação com 1% de CLNAs (α-ESA e/ou PA) por seis semanas não afetou significativamente a ingestão alimentar, o peso corporal e dos tecidos de camundongos (YUAN et al., 2009[bd]). Yamasaki et al. (2006) relataram que o peso corporal e o tecido adiposo não foram afetados em camundongos C57BL/6N alimentados com dietas experimentais contendo 0,12% e 1,2% de PSO, rico em PA, por três semanas. Arao et al. (2004[a]) mostraram que a ingestão de uma dieta suplementada com o óleo de cártamo (9%) e o PSO (1%) por duas semanas, não afetou o peso do tecido adiposo branco abdominal em ratos *Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty* (OLETF). No entanto, Koba et al. (2002) mostraram que CLNAs reduziu o peso do tecido adiposo perirenal em uma maior proporção quando comparado com ácido linoléico (LA), CLA, e LNA em ratos *Sprague-Dawley*. Os mesmos autores demonstraram posteriormente que a suplementação com o PSO diminuiu o peso do tecido adiposo perirenal em camundongos CD-1 em um modo dependente da dose após quatro semanas de alimentação (KOBA et al., 2007). Chardigny et al. (2003) também encontraram que a suplementação com ácido calêndico (C18:3-8*t*,10*t*,12*c*) reduziu significativamente o teor de gordura corporal em camundongos CD-1

Alguns estudos têm encontrado que a suplementação com CLNAs, provenientes de óleos ricos nesses compostos e incorporados na dieta, diminui significativamente o CT no soro (KOBA et al., 2002; DHAR et al., 2006), a apoB-100 (ARAO et al., 2004[b]) e os TG no tecido hepático (ARAO et al., 2004[ab]). No entanto, Yang et al. (2005) mostraram que a suplementação com 12,2 a 12,7 g/kg de PA e α-ESA por 42 dias não afetou a concentração de TG, CT, HDL-C (lipoproteína de alta densidade - colesterol) e não HDL-C séricos, mas se mostrou efetiva na redução do CT no fígado de hamsters. Por outro lado, Yamasaki et al. (2006) relataram um aumento significativo nas concentrações de TG e fosfolipídios séricos, mas não no CT sérico em ratos alimentados com 0,12% e 1,2% de PSO. Koba et al. (2007[b]) não encontraram efeito significativo da ingestão de PA nos lipídeos séricos de camundongos. No entanto, verificaram que as concentrações de TG no fígado foram

significativamente menores quando comparados ao grupo controle. Esta observação está de acordo com os resultados encontrados por Yuan et al. (2009[d]), que verificaram redução na concentração de TG no fígado dos animais alimentados com α-ESA ou PA durante seis semanas quando comparado ao grupo controle, sem, no entanto, alterar as concentrações de TG, CT e frações HDL-C e não HDL-C no soro de camundongos.

Existem poucos relatos sobre o efeito dos CLNAs no perfil lipídico de seres humanos. Mirmiran et al. (2010) concluíram que o consumo de PSO durante quatro semanas por indivíduos hiperlipidêmicos não alterou os níveis de CT e da fração LDL-C, mas reduziu os TG e a razão TG : HDL-C. Estudos adicionais são necessários para confirmar os efeitos e seus mecanismos associados ao consumo de CLNAs no ganho de peso corpóreo e no perfil de lipídeos no sangue.

Hontecillas et al. (2008) mostraram que a suplementação alimentar de ratos com ácido catálpico (C18:3-9*t*,11*t*,13*c*) durante 78 dias melhorou a glicemia de jejum, as concentrações de insulina e reforçou a capacidade de normalizar as concentrações de glicose plasmática após o teste de tolerância à glicose em um modelo de obesidade induzida pela dieta. Estes achados também foram encontrados pelos mesmos autores, ao avaliarem camundongos que receberam PA, outro isômero de CLNA (HONTECILLAS et al., 2009). McFarlin et al. (2009) concluíram que o consumo de PSO (consumo médio de 61,79 mg/dia) foi associado a uma melhora na sensibilidade à insulina em camundongos CD-1, sugerindo a redução do risco de desenvolver diabetes tipo 2. Mais recentemente, Vroegrijk et al. (2011), também concluíram que o PSO dietético melhorou a obesidade e a resistência à insulina induzidas por dieta hiperlipídica em camundongos. No entanto, a suplementação dietética por 28 dias com *Trichosanthes kirilowii* Maxim. (TK sementes) ricas em PA, não mostrou efeito significativo sobre as concentrações séricas de insulina, de glicose de jejum e da sensibilidade à insulina avaliada pelo índice HOMA-IR (*homeostasis model assessment – insulin resistance*) em humanos (YUAN et al., 2009[b]).

3.3.2 Atividade antioxidante dos CLNAs

Com o avanço das doenças relacionadas ao estresse oxidativo, os antioxidantes naturalmente presentes nos alimentos vêm ganhando um grande interesse nos últimos anos (SAHA; GHOSH, 2009). Estudos mostraram que os CLNAs suprimem o crescimento de células tumorais através de um mecanismo que envolve a peroxidação lipídica (TSUZUKI et al., 2004; IGARASHI; MIYAZAWA, 2000). Grossmann et al. (2009) observaram que quando células de câncer de mama foram tratadas com α-ESA, na presença do antioxidante α-tocotrienol (20 mmol/L), a inibição do crescimento celular e o efeito apoptótico do α-ESA foram perdidos. Assim, concluíram que o α-ESA bloqueia a proliferação das células cancerígenas mamárias e induz a apoptose através de um mecanismo que pode ser dependente da oxidação. Embora os mecanismos das atividades biológicas referentes aos CLNAs sejam relacionados à oxidação, muitos resultados controversos são relatados (YANG et al., 2009).

In vivo, Noguchi et al. (2001) demonstraram que os CLNAs aumentaram significativamente as concentrações de hidroperóxidos no plasma e a oxidação lipídica no fígado. Em contrapartida, Dhar et al. (1999) relataram anteriormente que o CLNA presente no óleo da semente de *karela* (Melão-de-São-Caetano) tem ação contra a peroxidação lipídica, utilizando o método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), em ratos alimentados por quatro semanas e que 0,5% de α-ESA em relação ao lipídio dietético foi a dose ideal para este efeito. Mukherjee et al. (2002) examinaram a atividade do PA suplementado na dieta de ratos durante 14 semanas e em diferentes concentrações (0,6; 1,2; 2,4%), e também pareceu ser eficiente como antioxidante, com atividade antioxidante máxima na dose de 0,6% de PA; embora, tenha sido observado um efeito pró-oxidante na concentração de 1,2%. É provável que, nas condições acima citadas, os CLNAs podem ter efeito em reduzir a formação de hidroperóxidos, diminuindo a formação de radicais livres e a peroxidação dos PUFAs (ácidos graxos poliinsaturados) na membrana do eritrócito e de outros lipídeos. Outra possível explicação pode ser que a biohidrogenação ou a adição de radicais livres a uma das ligações duplas conjugadas dos CLNAs poderia ter ocorrido, resultando na formação de

dienos conjugados que podem ter agido como antioxidantes (DHAR et al., 1999; SAHA; GHOSH, 2009).

Dhar et al. (2006) investigaram o efeito da dieta contendo CLNAs sobre a peroxidação lipídica em ratos com diabetes *mellitus* induzida por aloxana. A peroxidação lipídica na LDL e na membrana eritrocitária foi reduzida significativamente em cada um dos grupos experimentais (0,5% de CLNAs; 0,15% de α-tocoferol; 0,25% de CLNAs + 0,15% de α-tocoferol) em relação ao grupo controle. A dieta com CLNAs + α-tocoferol promoveu maior redução da peroxidação lipídica no fígado e nos lipídeos de membrana do que a dieta com α-tocoferol sozinho.

Recentemente, Saha e Ghosh (2012) mostraram que CLNAs (α-ESA e PA na dose de 0,5% do total de lipídeos) reduziu significativamente o estresse oxidativo causado pela diabetes induzida por estreptozotocina em ratos albinos; observados através da redução na peroxidação lipídica e restauração das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT e glutationaperoxidase - GPx), da glutationa reduzida (GSH) e redução dos níveis da óxido nítrico sintase (NOS) no pâncreas, sangue e lisado de eritrócitos. Esses mesmos autores analisaram também a influência de dois isômeros de CLNAs (0,5% dos lipídeos totais ofertados por 15 dias) na atividade antioxidante contra o estresse oxidativo induzido pelo arsênico. O resultado sugere que o arsenito de sódio alterou a atividade das enzimas antioxidantes no plasma e eritrócitos, homogenatos de fígado e cérebro, enquanto que o α-ESA e o PA aumentaram a atividade da SOD, CAT e GPx e diminuíram a atividade da enzima NOS para o nível normal. Tem sido observada diferença na eficácia dos dois isômeros estudados, o que é devido ao arranjo *cis-trans* antagônicos nas moléculas. Neste estudo, o α-ESA foi mais eficiente como antioxidante do que o PA devido ao seu elevado teor de *trans* (SAHA; GHOSH, 2009, 2011).

Em humanos, Yuan et al. (2009[b]) relataram que a concentração de 8-iso-PGF2*α*, o maior F2-isoprostano que avalia o nível de estresse oxidativo *in vivo* (ele é formado em humanos e animais pela peroxidação não enzimática do ácido araquidônico, catalisada por radical livre), na urina foi elevada

significativamente pela suplementação dietética com sementes de TK ricas em PA; indicando que PA aumenta a peroxidação lipídica em humanos.

3.3.3 Ação molecular dos CLNAs

A regulação das ações moleculares por componentes dietéticos naturais representa uma estratégia terapêutica alternativa em doenças inflamatórias, tais como: doença inflamatória intestinal, artrite reumatóide, aterosclerose e síndrome metabólica que são reconhecidas como os maiores problemas de saúde em todo o mundo. Uma característica comum dessas doenças é a produção excessiva de mediadores pró-inflamatórios, tais como TNFα, GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-8, leucotrieno B4 e PAF; a presença de células inflamatórias altamente ativadas, como neutrófilos, monócitos e macrófagos; e a produção excessiva de espécies reativas ao oxigênio (EROS) (BOUSSETTA et al., 2009). Estes autores avaliaram o efeito do PA na hiperativação de neutrófilos induzida por TNFα *in vitro* e na inflamação do cólon *in vivo* e concluíram que o PA exerce um potente efeito antiinflamatório, por meio da inibição de TNFα induzida por injeção de produção de EROS e liberação de mieloperoxidase (MPO) pelos neutrófilos, resultando em menor dano tecidual.

Bassaganya-Riera et al. (2010) observaram em camundongos que a ingestão de PA aumenta a expressão de PPAR-δ no cólon, do fator de crescimento de queratinócitos e do receptor nuclear órfão RORγt; além de suprimir o TNFα derivados de macrófagos M1 do cólon. Nos linfonodos mesentéricos (isto é, sítios indutivo da mucosa), o PA aumentou os níveis de IL-17 e IFN-γ em células de linfócitos $CD8^+$ T. Os autores apresentaram evidências moleculares *in vivo*, sugerindo que o PA modula respostas imunológicas nas mucosas e melhora a inflamação do intestino através de mecanismos dependentes do PPAR-γ e -δ. Na mesma direção, Hontecillas et al. (2009) investigou se o PA ativa PPAR-γ, um importante alvo terapêutico para diabetes e inflamação, e verificaram que a dieta contendo PA diminuiu as concentrações de glicose plasmática de jejum, melhorou a capacidade de normalização da glicose, suprimiu a ativação do fator de transcrição NF-kB, a

expressão de TNFα e de genes responsivos ao PPAR-α e -γ no músculo esquelético e no tecido adiposo de camundongos. Estes achados demonstraram que o PA se liga e ativa robustamente ao PPAR-γ, aumenta a expressão de genes responsivos ao PPAR-γ, o qual pode ser importante para melhorar a diabetes e a inflamação (HONTECILLAS et al., 2009).

Os mesmos autores já haviam demonstrado que a suplementação alimentar com ácido catálpico em camungongos, outro isômero de CLNA, aumenta a expressão do PPAR-α e dos genes responsivos ao PPAR-α no tecido adiposo branco (TAB), enquanto que a expressão de PPAR-γ e -δ não foram afetadas significativamente pelo ácido catálpico no TAB. Estes resultados sugerem que os efeitos metabólicos do ácido catálpico no metabolismo da glicose e dos lipídios podem ser mediados através de um mecanismo dependente de PPAR-α (HONTECILLAS et al., 2008). Além disso, estudos mostram que o óleo da semente de Melão-de-São-Caetano, que contém um elevado nível de 9*c*,11*t*,13*t*-CLNA, aumenta a expressão protéica e gênica do PPAR-γ em células Caco-2 e em ratos (KOHNO et al., 2004; YASUI et al., 2005); e que o óleo de tungue contendo α-ESA ativa o PPAR-γ em células endoteliais humanas da veia umbilical (TSUZUKI; KAWAKAMI, 2008).

Tran et al. (2010) avaliaram o ácido punícico presente na semente da romã como modulador do receptor de estrogênio seletivo (SERMs) *in vitro*. O PA inibiu (IC_{50}) o receptor de estrogênio (ER) α e β em 7,2 mM e 8,8 mM, respectivamente; eles mostraram também que o isômero α-ESA inibiu ERα/ERβ em 6,5/7,8 mM, então ambos PA e α-ESA são SERMs. Portanto, o PA, como componente principal do PSO, atua como SERMs e, potencialmente, irá também atuar no futuro como um efetivo agente quimiopreventivo para o câncer de mama.

Saha e Ghosh (2012) mostraram que a suplementação com CLNAs (α-ESA e PA – na dose de 0,5% do total de lipídeos) durante quatro semanas foi capaz de restaurar o quadro de inflamação causada pela diabetes induzida por estreptozotocina em ratos albinos; uma vez que reduziu significativamente a expressão de citocinas inflamatórias tais como TNFα e IL-6 no sangue e a expressão do fator de transcrição NFκB (p65) hepática.

Neste sentido, os ácidos graxos conjugados presentes no óleo da semente de romã e em outros alimentos, podem fornecer uma nova estratégia terapêutica alternativa em muitas doenças, como as doenças inflamatórias e câncer (BOUSSETTA et al., 2009).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos confirmam a presença do ácido graxo punícico, um isômero conjugado do ácido α-linolênico (CLNA), em altas porcentagens no óleo da semente de romã. Isto tem levado a um aumento no número de pesquisas que avaliam este óleo como um potente nutracêutico alimentar. Embora existam evidências com estudos *in vitro* e em modelos animais que suportem as propriedades bioativas dos CLNAs, alguns estudos envolvendo esses isômeros apresentam resultados inconclusivos e/ou contraditórios. Os relatos referentes à atividade antioxidante dos CLNAs demonstram que as informações ainda são limitadas. Além disso, estudos envolvendo humanos são escassos e, alguns efeitos observados em estudos com animais não são os mesmos verificados em seres humanos. Consequentemente, é difícil estabelecer claramente o papel dos CLNAs em melhorar a saúde. Neste sentido, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos e os efeitos fisiológicos dos isômeros de CLNAs para proporcionar maior segurança e estabelecer recomendações relativas à sua utilização.

5 REFERÊNCIAS

ARAO, K.; WANG, Y.M.; INOUE, N.; HIRATA, J.; CHA, J.Y.; NAGAO, K.; YANAGITA T. Dietary effect of pomegranate seed oil rich in 9*cis*, 11*trans*, 13*cis* conjugated linolenic acid on lipid metabolism in obese, hyperlipidemic OLETF Rats. **Lipids in Health and Disease**, v.3, p.24-30, 2004[a].

ARAO, K.; YOTSUMOTO, H.; HAN, S.Y.; NAGAO, K.; YANAGITA, T. The 9*cis*, 11*trans*,13*cis* isomer of conjugated linolenic acid reduces apolipoprotein B100 secretion and triacylglycerol synthesis in HepG2 cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.68, p.2643-2645, 2004[b].

BASSAGANYA-RIERA, J.; DIGUARDO, M.; CLIMENT, M.; VIVES, C.; HORNA, A.; SANCHEZ, S.; ORPI, M.; DURAN, E.; EINERHAND, A. W. C.; O'SHEA, M.; HONTECILLAS, R. Punicic acid modulates mucosal immune responses and prevents gut inflammation through PPAR γand δ-dependent mechanisms. **The FASEB Journal,** v.24 (Meeting Abstracts), p.926.6, 2010.

BOUROSHAKI, M.T.; SADEGHNIA, H.R.; BANIHASAN, M.; YAVARI, S. Protective effect of pomegranate seed oil on hexachlorobutadiene-induced nephrotoxicity in rat. **Renal Failure**, v.32, p.612-617, 2010.

BOUSSETTA, T.; RAAD, H.; LETTÈRON, P.; GOUGEROT-POCIDALO, M.A.; MARIE, J.C.; DRISS, F.; EL-BENNA, J. Punicic acid a conjugated linolenic acid inhibits TNFα-induced neutriphil hyperactivation and protects from experimental colon inflammation in rats. **PLoS ONE**, v.4, p.e6458-6469, 2009.

CALIGIANI, A.; BONZANINI, F.; PALLA, G.; CIRLINI, M.; BRUNI, R. Characterization of a potential nutraceutical ingredient: Pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil unsaponifiable fraction. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.65, p.277-283, 2010.

CAO, Y.; CHEN, J.; YANG, L.; CHEN, Z.Y. Differential incorporation of dietary conjugated linolenic and linoleic acids into milk lipids and liver phospholipids in lactating and suckling rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.20, p.685-693, 2009.

CARVALHO, E.B.T.; MELO, I.L.P.; MANCINI-FILHO, J. Chemical and physiological aspects of isomers of conjugated fatty acids. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, p.295-307, 2010.

CHARDIGNY, J.M.; HASSELWANDER, O.; GENTY, M.; KRAEMER, K.; PTOCK, A.; SÉBÉDIO, J.L. Effect of conjugated FA on feed intake, body composition, and liver FA in mice. **Lipids**, v.38, p.895-902, 2003.

COAKLEY, M.; BANNI, S.; JOHNSON, M.C.; MILLS, S.; DEVERY, R.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P.; STANTON, C. Inhibitory Effect of Conjugated *α*-Linolenic Acid from Bifidobacteria of Intestinal Origin on SW480 Cancer Cells. **Lipids**, v.44, p.249-256, 2009.

DHAR, P.; BHATTACHARYYA, D.; BHATTACHARYYA, D.K.; GHOSH, S. Dietary Comparison of Conjugated Linolenic Acid (9 *cis*, 11 *trans*, 13 *trans*) and a-Tocopherol Effects on Blood Lipids and Lipid Peroxidation in Alloxan-Induced Diabetes Mellitus in Rats. **Lipids**, v.41, p.49-54, 2006.

DHAR, P.; GHOSH, S.; BHATTACHARYYA, D.K. Dietary effects of conjugated octadecatrienoic fatty acid (9*cis*, 11*trans*, 13*trans*) levels on blood lipids and nonenzymatic *in vitro* lipid peroxidation in rats. **Lipids**, v.34, p. 109-114, 1999.

ELFALLEH, W.; YING, M.; NASRI, N.; SHENG-HUA, H.; GUASMI, F.; FERCHICHI, A. Fatty acids from Tunisian and Chinese pomegranate (*Punica grantum* L.) seeds. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.62, p.200-206, 2011.

GROSSMANN, M.E.; MIZUNO, N.K.; DAMMEN, M.L.; SCHUSTER, T.; RAY, A.; CLEARY, M.P. Eleostearic acid inhibits breast cancer proliferation by means of an oxidation-dependent mechanism. **Cancer Prevention Research**, v.2, p.879-886, 2009.

GROSSMANN, M.E.; MIZUNO, N.K.; SCHUSTER, T.; CLEARY, M.P. Punicic acid is an ω-5 fatty acid capable if inhibiting breast cancer proliferation. **International Journal of Oncology**, v.36, p.421-426, 2010.

HENNESSY, A.A.; ROSS, R.P.; DEVERY, R.; STANTON, C. The health promoting properties of the conjugated isomers of α-linolenic acid. **Lipids**, v.40, p.105-119, 2011.

HONTECILLAS, R.; DIGUARDO, M.; DURAN, E.; ORPI, M.; BASSAGANYA-RIERA, J. Catalpic acid decreases abdominal fat deposition, improves glucose homeostasis and upregulates PPAR α expression in adipose tissue. **Clinical Nutrition**, v.27, p.764-772, 2008.

HONTECILLAS, R.; O'SHEA, M.; EINERHAND, A.; DIGUARDO, M.; BASSAGANYA-RIERA, J. Activation of PPAR γ and α by Punicic Acid Ameliorates Glucose Tolerance and Suppresses Obesity-Related Inflammation. **Journal of the American College of Nutrition**, v.28, p.184-195, 2009.

IGARASHI, M.; MIYAZAWA, T. Newly recognized cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on cultured human tumor cells. **Cancer Letters**, v.148, p.173-179, 2000.

IGARASHI, M.; MIYAZAWA, T. Preparation and fractionation of conjugated trienes from alpha-linolenic acid and their growth-inhibitory effects on human tumor cells and fibroblasts. **Lipids**, v.40, p.109-113, 2005.

JARDINI, F.A.; MANCINI FILHO, J. Composição centesimal e perfil dos ácidos graxos de romã (*Punica granatum*, L.) cultivada no Brasil. **Higiene Alimentar**, v.21, p.81-85, 2007.

JOHANNINGSMEIER, S.D.; HARRIS, G.K. Pomegranate as a functional food and nutraceutical source. The Annual Review of Food Science and Technology, v.2, p.181-201, 2011.

KINAMI, T.; HORII, N.; NARAYAN, B.; ARATO, S.; HOSOKAWA, M.; MIYASHITA, K.; NEGISHI, H.; IKUINA, J.; NODA, R.; SHIRASAWA, S. Occurrence of conjugated linolenic acids in purified soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society** (JAOCS), v.84, p.23-29, 2007.

KOBA, K.; AKAHOSHI, A.; YAMASAKI, M.; TANAKA, K.; YAMADA, K; IWATA, T.; KAMEGAI, T; TSUTSUMI, K; SUGANO, M. Dietary Conjugated Linolenic Acid in Relation to CLA Differently Modifies Body Fat Mass and Serum and Liver Lipid Levels in Rats. **Lipids**, v.34, p.343-350, 2002.

KOBA, K.; BELURY, M.A.; SUGANO, M. Potential health benefits of conjugated trienoic acids. **Lipid Technology**, v.19, p.200-203, 2007.

KOBA, K.; IMAMURA, J.; AKASHOSHI, A.; KOHNO-MURASE, J.; NISHIZONO, S.; IWABUCHI, M.; TANAKA, K.; SUGANO, M. Genetically Modified Rapeseed Oil Containing *cis*-9, *trans*-11, *cis*-13-Octadecatrienoic Acid Affects Body Fat Mass and Lipid Metabolism in Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.3741-3748, 2007.

KOHNO, H.; SUZUKI, R.; YASUI, Y.; HOSOKAWA, M.; MIYASHITA, K.; TANAKA, T. Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats. **Cancer Science**, v.95, p.481-486, 2004.

KÝRALAN, M.; GÖLÜKCÜ, M.; TOKGÖZ, H. Oil and conjugated linolenic acid contents of seeds from important pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. **Journal of the American Oil Chemists' Society** (JAOCS), v.86, p.985-990, 2009.

LAM, C. K.; CHEN, J.; CAO, Y.; YANG, L.; WONG, Y.M.; YEUNG, S.Y.V.; YAO, X.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y. Conjugated and non-conjugated octadecaenoic acids affect differently intestinal acyl coenzyme A: Cholesterol acyltransferase activity. **Atherosclerosis**, v.198, p.85-93, 2008.

LANSKY, E.P.; NEWMAN, R.A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.177-206, 2007.

McFARLIN, B.K.; STROHACKER, K.A.; KUEHT, M.L. Pomegranate seed oil consumption during a period of high-fat feeding reduces weight gain and reduces type 2 diabetes risk in CD-1 mice. **British Journal of Nutrition**, v.102, p.54-59, 2009.

MIGUEL, M.G.; NEVES, M.A.; ANTUNES, M.D. Pomegranate (*Punica granatum* L.): A medicinal plant with myriad biological properties – A short review. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.4, p.2836-2847, 2010.

MIRANDA, J.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; MACARULLA, M.T.; CHURRUCA, I.; GARCÍA, C.; RODRÍGUEZ, V.M.; SIMÓN, E.; PORTILHO, M.P. A comparison between CLNA and CLA effects on body fat, serum parameters and liver composition. **The Journal of Physiology and Biochemistry**, v.65, p.25-32, 2009.

MIRMIRAN, P.; FAZELI, M.R.; ASGHARI, G.; SHAFIEE, A.; AZIZI, F. Effect of pomegranate seed oil on hyperlipidaemic subjects: a double-blind placebo-controlled clinical Trial. **British Journal of Nutrition**, v.104, p.402-406, 2010.

MODARESI, J.; NASRI, M.H.F.; RASHIDI, L.; DAYANI, O.; KEBREAB, E. Short communication: Effects of supplementation with pomegranate seed pulp on concentrations of conjugated linoleic acid and punicic acid in goat milk. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.4075-4080, 2011.

MUKHERJEE, C.; BHATTACHARYYA, S.; GHOSH, S.; BHATTACHARYYA, D.K. Dietary Effects of Punicic Acid on the Composition and Peroxidation of Rat Plasma Lipid. **Journal of Oleo Science**, v.51, p.513-522, 2002.

NAGAO, K.; YANAGITA, T. Bioactive lipids in metabolic syndrome. **Progress in Lipid Research**, v.47, p.127-146, 2008.

NAGAO, K.; YANAGITA, T. Conjugated fatty acids in food and their health benefits. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, p.152-157, 2005.

NEMER, K. **The Role of Punicic Acid (c9t11c13-CLNA) in Lipid and Energy Metabolism of Mice.** 18f. A Senior Honors Research Thesis - The Ohio State University, Ohio, 2009.

NOGUCHI, R.; YASUI, Y.; SUZUKI, R.; HOSOKAWA, M.; FUKUNAGA, K.; MIYASHITA, K. Dietary Effects of Bitter Gourd Oil on Blood and Liver Lipids of Rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.396, p.207-212, 2001.

PANDE, G.; AKOH, C.C. Antioxidant capacity and lipid characterization of six Georgia-grown pomegranate cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.9427-9436, 2009.

PARASHAR, A.; SINHA, N.; SINGH, P. Lipid contents and fatty acids composition of seed oil from twenty five pomegranates varieties grown in India. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v.2, p.12-15, 2010.

PLOURDE, M.; SERGIEL, J.P.; CHARDIGNY, J.M.; GRÉGOIRE, S.; ANGERS, P.; SÉBÉDIO, J.L. Absorption and metabolism of conjugated α-linolenic acid given as free fatty acids or triacylglycerols in rats. **Nutrition & Metabolism**, v.3, p.8-14, 2006.

SAHA, S.S.; GHOSH, M. Antioxidant and anti-inflammatory effect of conjugated linolenic acid isomers against streptozotocin-induced diabetes. **British Journal of Nutrition**, v.108, p.974-983, 2012.

SAHA, S.S.; GHOSH, M. Antioxidant effect of vegetable oils containing conjugated linolenic acids isomers against induced tissue lipid peroxidation and inflammation in rat model. **Chemico-Biological interactions,** v.190, p.109-120, 2011.

SAHA, S.S.; GHOSH, M. Comparative study of antioxidant activity of α-eleostearic acid and punicic acid against oxidative stress generated by sodium arsenite. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.2551-2556, 2009.

SASSANO, G.; SANDERSON, P.; FRANX, J.; GROOT, P.; STRAALEN, J.V.; BASSAGANYA-RIERA, J. Analysis of pomegranate seed oil for the presence of jacaric acid. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.89, p.1046-1052, 2009.

SUZUKI, R.; NOGUCHI, R.; OTA, T.; ABE, M.; MIYASHITA, K.; KAWADA, T. Cytotoxic Effect of Conjugated Trienoic Fatty Acids on Mouse Tumor and Human Monocytic Leukemia Cells. **Lipids**, v.36, p.477-482, 2001.

SYED, D.N.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. **Seminars in Cancer Biology**, v.17, p.377-385, 2007.

TRAN, H.N.A.; BAE, S.Y.; SONG, B.H.; LEE, B.H.; BAE, Y.S; KIM, Y.H.; LANSKY, E.P.; NEWMAN, R.A. Pomegranate (*punica granatum*) seed linolenic acid isomers: concentration-dependent modulation of estrogen receptor activity. **Endocrine Research**, v.35, p.1-16, 2010.

TSUZUKI, T.; KAWAKAMI, Y. Tumor angiogenesis suppression by α-eleostearic acid, α linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via peroxisome proliferator-activated receptor γ. **Carcinogenesis**, v.29, p.797-806, 2008.

TSUZUKI, T.; KAWAKAMI, Y.; ABE, R.; NAKAGAWA, K.; KOBA, K.; IMAMURA, J.; IWATA, T.; IKEDA, I.; MIYAZAWA, T. Conjugated Linolenic Acid Is Slowly Absorbed in Rat Intestine, but Quickly Converted to Conjugated Linoleic Acid. **The Journal of Nutrition**, v.136, p.2153–2159, 2006.

TSUZUKI, T.; TOKUYAMA, Y.; IGARASHI, M.; MIYAZAWA, T. Tumor growth suppression by α-eleostearic acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via lipid peroxidation. **Carcinogenesis**, v.25, p.1417-1425, 2004.

VIUDA-MARTOS, M.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. Pomegranate and its many functional components as related to human health: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, p.635-654, 2010.

VROEGRIJK, I.O.; VAN DIEPEN, J.A.; VAN DEN BERG S.; WESTBROEK, I.; KEIZER, H.; GAMBELLI, L.; HONTECILLAS, R.; BASSAGANYA-RIERA, J.; ZONDAG, G.C.; ROMIJN, J.A.; HAVEKES, L.M.; VOSHOL, P.J. Pomegranate seed oil, a rich source of punicic acid, prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.1426-1430, 2011.

YAMASAKI, M.; KITAGAWA, T.; KOYANAGI, N.; CHUJO, H.; MAEDA, H.; KOHNO-MURASE, J.; IMAMURA, J.; TACHIBANA, H.; YAMADA, K. Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice. **Nutrition**, v.22, p.54-59, 2006.

YANG, L.; CAO, Y.; CHEN, J.N.; CHEN, Z.Y. Oxidative Stability of Conjugated Linolenic Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.10, p.4212-4217, 2009.

YANG, L.; LEUNG, K.Y.; CAO, Y.; HUANG, Y.; RATNAYAKE, W.M.N.; CHEN, Z.Y. α-Linolenic acid but not conjugated linolenic acid is hypocholesterolaemic in hamsters. **British Journal of Nutrition**, v.93, p.433-438, 2005.

YASUI, Y.; HOSOKAWA, M.; SAHARA, T.; SUZUKI, R.; OHGIYA, S.; KOHNO, H.; TANAKA, T.; MIYASHITA, K. Bitter gourd seed fatty acid rich in 9*c*,11*t*,13*t* conjugated linolenic acid induces apoptosis and up-regulates the GADD45, p53 and PPARγ in human colon cancer Caco-2 cells. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.73, p.113-119, 2005.

YUAN, G.F.; SINCLAIR, A.J.; SUN, H.Y.; Li, D. Fatty acid composition in tissues of mice fed diets containing conjugated linolenic acid and conjugated linoleic acid. **Journal of Food Lipids**, v.16, n.2, p.148-163, 2009[a].

YUAN, G.F.; SINCLAIR, A.J.; XU, C.; LI, D. Incorporation and metabolism of punicic acid in healthy young humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.53, p.1336-1342, 2009[b].

YUAN, G.F.; SINCLAIR, A.J.; ZHOU, C.Q.; Li, D. *α*-Eleostearic acid is more effectively metabolized into conjugated linoleic acid than punicic acid in mice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.89, p.1006–1011, 2009[c].

YUAN, G.F.; SUN, H.; SINCLAIR, A.J.; Li, D. Effects of conjugated linolenic acid and conjugated linoleic acid on lipid metabolism in mice. ***European Journal of Lipid Science* and*Technology***, v.111, p.537-545, 2009[d].

YUAN, G.F.; WAHLQVIST, M.L.; YUAN, J.Q.; WANG, Q.M.; LI, D. Effect of punicic acid naturally occurring in food on lipid peroxidation in healthy young humans. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.89, p.2331-2335, 2009[e].

YUAN, G.F.; YUAN, J.Q.; Li, D. Punicic Acid from *Trichosanthes kirilowii* Seed Oil Is Rapidly Metabolized to Conjugated Linoleic Acid in Rats. **Journal of Medicinal Food,** v.12, p.416-422, 2009[f].

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO DA IDENTIDADE, QUALIDADE E ESTABILIDADE DO ÓLEO DA SEMENTE DE ROMÃ (Punica grantum L.*)*

RESUMO

Este estudo teve como objetivo caracterizar o óleo da semente de romã (PSO) e avaliar sua qualidade e estabilidade comparando-o com o óleo de linhaça (OL). O perfil de ácidos graxos e fitosteróis foram analisados por cromatografia gasosa e o conteúdo de tocoferóis por cromatografia líquida de alta eficiência. As características de qualidade dos óleos foram analisadas conforme recomendado pela *American Oil Chemists' Society* (AOCS) e a estabilidade foi avaliada nos sistemas: ensaio radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), cooxidação de substratos pelo sistema modelo β-caroteno / ácido linoléico e Rancimat®. O perfil de ácidos graxos confirmou a presença do ácido α-linolênico (52%) no OL e do ácido punícico (55%) no PSO como majoritários. O PSO apresentou maior concentração de tocoferóis (175±4 mg/100g) e fitosteróis (539±11 mg/100g), enquanto o OL apresentou 51±4 e 328±11 mg/100g, respectivamente. Estes óleos apresentaram-se dentro dos padrões de qualidade. Com relação aos sistemas de cooxidação do β-caroteno / ácido linoléico e de varredura do radical DPPH•, o PSO apresentou melhor estabilidade oxidativa em comparação ao OL, apesar de ambos apresentarem baixa estabilidade frente ao método Rancimat®.

Palavras chave: óleo da semente de romã, caracterização, estabilidade.

1 INTRODUÇÃO

As evidências demonstram que não simplesmente a quantidade de gordura consumida, mas também o tipo de gordura e particularmente ácidos graxos específicos (*Trans*, CLAs, CLNAs), são fatores importantes tanto na saúde como no desenvolvimento de certas doenças no organismo humano (ZOCK, 2006). Consequentemente, a função dos óleos e gorduras no organismo humano tem sido amplamente pesquisada nas últimas décadas e têm levado a um aprofundamento no conhecimento da composição e estrutura química dos óleos e gorduras e, portanto, a uma melhor caracterização dos mesmos (MANCINI-FILHO; TAKEMOTO; AUED-PIMENTEL, 2007). A determinação da classe de lipídeos dos alimentos pode auxiliar na decisão da sua aplicação nas indústrias de alimentos e na saúde. Neste sentido, o perfil lipídico de várias frutas e suas sementes tem sido caracterizado e vários componentes bioativos isolados (PANDE; AKOH, 2009).

O óleo da semente de romã (PSO – *Pomegranate seed oil*) tem despertado interesse nos últimos anos devido a presença, em altas porcentagens, especificamente de um ácido graxo conjugado em sua composição: o ácido punícico (PA – *Punicic acid*; C18:3 – 9*c*,11*t*,13*c*). O PA é um isômero posicional e geométrico do ácido α-linolênico (LNA – *Linolenic acid*; C18:3 – 9*c*,12*c*,15*c*) e, por sua característica em apresentar a estrutura conjugada das suas três duplas ligações, sendo uma delas na posição *trans*, tem sido utilizado em pesquisas visando a sua participação em processos fisiológicos. Segundo Elfalleh et al. (2011), o PSO é considerado um poderoso agente beneficiador da saúde devido suas propriedades antioxidante, anticarcinogênica e antilipidêmica.

As atividades biológicas demonstradas em estudos tanto *in vitro* como *in vivo*, despertam o interesse de separar e identificar os ácidos graxos conjugados (AGCs) (La FUENTE; LUNA; JUÁREZ, 2006). Ao analisar AGCs é importante que o método seja capaz de separar e quantificar estes isômeros geométricos e posicionais, evitando isomerizações adicionais durante todas as etapas de derivatização (CHRISTIE; DOBSON; ADLOF, 2007). A composição

de ácidos graxos juntamente com a de fitosteróis são reconhecidas como características de identidade dos óleos vegetais (MANCINI-FILHO; TAKEMOTO; AUED-PIMENTEL, 2007). Os fitosteróis estão presentes na classe de substâncias estimadas como benéficas para a saúde, pricipalmente por sua capacidade de inibir a absorção do colesterol. Os tocoferóis são bem conhecidos como conservantes naturais e sua presença em óleos de sementes é frequentemente correlacionada com a relativa abundância de ácidos graxos insaturados (CALIGIANI et al., 2010).

Alguns pesquisadores relatam o efeito antioxidante dos AGCs como a possível explicação dos efeitos benéficos para a saúde (ALI et al., 2012; JOHANNINGSMEIER; HARRIS, 2011; TSUZUKI et al., 2004; YU, 2001). Entretanto, são poucos os estudos que avaliam a atividade antioxidante desses componentes *in vitro*. Segundo Elfalleh et al. (2011), os ácidos graxos conjugados são componentes oleosos, o qual tornam a aplicação de ensaios antioxidantes muito limitados devido a sua natureza lipossolúvel. Frente a esta característica, a avaliação se restringe apenas ao ensaio de varredura do radical DPPH• (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) na determinação da capacidade antioxidante dos isômeros do ácido linoléico conjugado (CLAs). Esses autores, assim como anteriormente YU (2001), verificaram que os CLAs possuem alta atividade de varredura de radical livre através do método DPPH•, o que pode contribuir para suas atividades biológicas. Esta observação está de acordo com Fagali e Catalá (2008), que também demonstraram a capacidade dos isômeros de CLAs em reagir reduzindo radicais livres através dos métodos de fotoemissão (utilizando o *terc*-butil hidroxiperóxido para induzir a peroxidação de PUFAs e medindo a redução da quimiluminescência da reação ao adicionar os isômeros de CLAs) e pela avaliação espectrofotométrica, medindo a redução na absorbância da solução contendo o radical DPPH• com a adição dos isômeros de CLAs.

Com relação aos isômeros conjugados do ácido α-linolênico (CLNAs), como é o caso do PA, os estudos ainda são limitados. Pouco se sabe sobre a identidade, qualidade e estabilidade de óleos contendo CLNAs. Neste sentido, torna-se importante a caracterização do PSO (rico em PA), que pode ser um componente dietético com possíveis efeitos promissores para a saúde.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar o óleo da semente de romã quanto ao perfil de ácidos graxos, tocoferóis e fitosteróis, bem como avaliar sua qualidade e estabilidade comparando-o com o óleo de linhaça, o qual contém o ácido α-linolênico como ácido graxo majoritário.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar os óleos quanto ao perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa, utilizando diferentes metodologias, e conteúdo tocoferóis e fitosteróis;
- ✓ Avaliar as características de qualidade dos óleos através dos índices de acidez, peróxido, *p*-anisidina e do valor do ácido tiobarbitúrico;
- ✓ Analisar a estabilidade dos óleos utilizando os sistemas de cooxidação ácido linoléico / β-caroteno, de varredura do radical DPPH• e Rancimat®.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

O óleo da semente de romã (PSO) foi obtido por importação direta junto à empresa *Green Source Organics* (Boynton Beach, USA). O produto foi obtido por prensagem a frio das sementes de romã, sendo constituído principalmente de ácido α-linolênico conjugado (PA; C18:3-9*c*,11*t*,13*c*). Para a comparação, foram utilizadas amostras de óleo de linhaça (OL) fornecidas pela

empresa Vital Âtman (Uchoa, Brasil), também obtido por prensagem a frio, cujo ácido graxo majoritário é o ácido α-linolênico (LNA; C18:3-9*c*,12*c*,15*c*).

3.2 Métodos

3.2.1 Perfil de ácidos graxos nos óleos

A identificação e quantificação dos ácidos graxos foram realizadas por cromatografia gasosa utilizando diferentes metodologias.

Preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos:

Para a preparação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos presentes nas amostras estudadas foram testados dois métodos de esterificação: Mista (Alcalina / Ácida) e Alcalina ($NaOCH_3$), conforme descrito por Christie, Sédédio e Juanédio (2001).

No primeiro método (Esterificação Mista), a fração lipídica (50 mg de óleo) contendo os ácidos graxos foi transferida para tubos de esterificação, as amostras foram diluídas em 1 mL de tolueno, foram adicionados 2 mL de métoxido de sódio ($NaOCH_3$) metanólico a 0,5 M e aquecido a 50°C por 10 minutos. Em seguida, foram acrescentados 3 mL de trifluoreto de boro (BF_3 – 14%) e novamente levado ao aquecimento em banho maria (50ºC por 10 minutos). Os tubos foram então resfriados em água corrente e adicionou-se 100 µL de ácido acético glacial, 5 mL de água destilada e 5 mL de hexano; a mistura foi agitada por 20 segundos em vortex e deixada em repouso para a separação de fases. A fase superior foi recuperada e filtrada com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). A fase inferior foi lavada novamente com 5 mL de hexano, agitada em vortex por 20 segundos e deixada em repouso para a separação de fases. A fase superior foi recuperada e filtrada em sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado em N_2 com o auxílio de aquecimento (banho maria a 40ºC), os ésteres metílicos foram ressuspensos com 2 mL de hexano e a solução foi transferida para o vial e injetado no cromatógrafo.

Para o segundo método (Esterificação Alcalina) seguiu-se as mesmas etapas descritas anteriormente, com exceção da fase que acrescenta-se o ácido (BF_3).

Identificação e quantificação dos ácidos graxos:

A identificação e quantificação dos ácidos graxos presentes nas amostras de óleo foram realizadas por cromatografia a gás, utilizando um cromatógrafo da marca Shimadzu GC, modelo 2010, com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida (100 m; 0,25 mm de diâmetro interno; 0,2 µm de espessura do filme / SP-2560) Foram testadas três condições cromatográficas (CC), a seguir.

(CC 1) - A primeira foi descrita por Kramer et al. (1997), cujo a temperatura da coluna foi: isotérmico a 70ºC por 4 minutos, e então aquecimento de 13ºC / min até 175ºC, permanecendo nesta temperatura por 27 minutos. Posteriormente foi aquecida a 4ºC por minuto até 215ºC e esta temperatura foi mantida por 31 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250ºC e 275ºC, respectivamente.

(CC 2) - A segunda foi descrita por Cordain et al. (2002), cujo a temperatura da coluna foi: isotérmico a 100ºC por 4 minutos, aquecimento de 10ºC por minuto até 175ºC, permanecendo nesta temperatura por 30 minutos. Posteriormente foi aquecida a 5ºC por minuto até 220ºC e esta temperatura foi mantida por 15,9 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram de 215ºC e 250ºC, respectivamente.

(CC 3) - A terceira foi descrita por Baublits et al. (2007) e a temperatura da coluna foi: isotérmico a 162ºC por 32 minutos, aquecimento de 1,4ºC por minuto até 195ºC, permanecendo nesta temperatura por 15 minutos. Posteriormente foi aquecida a 2ºC por minuto até 235ºC e esta temperatura foi mantida por 5 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250ºC e 250ºC, respectivamente.

Para as três condições testadas, foi utilizado o Hélio (1 mL/min) como gás de arraste e a razão de divisão da amostra no injetor (*split)* igual a 1 / 50.

A identificação dos ácidos graxos foi realizada com base na comparação com os tempos de retenção relativos à mistura de padrões de metil-ésteres C4-C24 (Sigma 18919) e para o ácido punícico, os tempos de retenção foram comparados e identificados de acordo com o que já foi apresentado na literatura.

3.2.2 Conteúdo de tocoferóis e esteróis nos óleos

A identificação e quantificação dos tocoferóis presentes no PSO e no OL foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficência (HPLC) enquanto o conteúdo de esteróis foi analisado por cromatografia gasosa, conforme descritos a seguir.

Tocoferóis:

A análise do conteúdo de tocoferóis foi realizada conforme recomendado pelo IAL (2005). Uma alíquota dos óleos foi diluída em hexano, filtrado em membrana de 0,22 μm e injetado no cromatógrafo. Foi utilizado um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu composto por um sistema isocrático, injetor automático e um detector de fluorescência (RF-10AXL), programado para 295 nm de excitação e 330 nm de emissão. Para a separação foi utilizada uma coluna de sílica Shim-pack CLC-Sil (M) 25 cm com fase móvel previamente filtrada e degaseificada, composta de hexano e álcool isopropílico (99:1) e fluxo de 1,0 mL/min. O α-tocoferol foi identificado por comparação do tempo de retenção do padrão sintético (Sigma T3251) e a quantificação realizada através de padronização externa. Os outros tocoferóis foram comparados e identificados de acordo com o que já foi apresentado na literatura e então, quantificados como equivalentes de α-tocoferol.

Fitosteróis:

A determinação de fitosteróis foi realizada em três etapas, conforme recomendado por Almeida (2009): saponificação a quente, utilizando KOH 3%

em banho maria a 50°C sob agitação durante três horas; extração da matéria insaponificável, utilizando 10 mL de hexano e submetidos a vortex por um minuto; e quantificação dos fitosteróis por cromatografia gasosa. Foi utilizado um cromatógrafo da marca Shimadzu GC, modelo 2010, com detector de ionização de chama e coluna de polimetilfenil siloxana (5% fenila, 60 m e 0,25 mm de diâmetro interno / DB-5). A temperatura da coluna foi: 150ºC por 0,1 minuto, e então aquecimento de 10ºC / min até 300ºC, permanecendo nesta temperatura por 10 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250ºC e 300ºC, respectivamente. Foi utilizado o Hélio (1 mL/min) como gás de arraste e a razão de divisão da amostra no injetor (*split)* igual a 1 / 50. A identificação dos picos foi realizada através de comparação do tempo de retenção das amostras com os padrões Sigma (campesterol – C5157, estigmasterol – S6126 e β-sitosterol – S9889) e a quantificação por padronização interna, utilizando como padrão interno 5α-colestane (Sigma C8003).

3.2.3 Características de qualidade dos óleos

As características de qualidade dos óleos foram avaliadas de acordo com os métodos descritos abaixo, conforme recomendado por Mancini-Filho, Takemoto e Aued-Pimentel (2007), pelo IAL (2005) e pela AOCS (2004).

Índice de acidez (IA):

O IA é definido como a quantidade em miligramas (mg) de base (hidróxido de potássio – KOH ou hidróxido de sódio – NaOH) necessária para neutralizar os ácidos graxos livres presentes em um grama (g) de óleo. Foram pesados 2 g de amostra em erlenmeyer de 125 mL, adicionados 25 mL de solução álcool : éter (1:2) e adicionadas duas gotas de solução de fenolftaleína. Após agitação foi realizada a titulação com NaOH a 0,1 M (Fator 1,05) até a coloração tornar-se rósea. Os cálculos foram realizados segundo a fórmula abaixo e os resultados expresso como mg de NaOH por g de amostra.

$$IA = (V \times F \times 3{,}99) \div M$$

Onde:

V= volume gasto de NaOH 0,1M
F= fator de correção da solução de NaOH
3,99= equivalente da solução de NaOH
M = massa da amostra (g)

Índice de peróxido (IP):

Os peróxidos são produtos da oxidação lipídica e, em meio ácido, liberam iodo a partir do iodeto de potássio. O iodo liberado é titulado pelo tiossulfato de sódio, permitindo, desta forma, a dosagem dos peróxidos nas amostras de óleo. Foi pesado um grama de óleo em erlenmeyer de 250 mL e adicionados 10 mL de clorofórmio. Após agitação, acrescentou-se 15 mL de ácido acético e 1 mL da solução saturada de iodeto de potássio, o erlenmeyer foi novamente agitado e deixado em repouso por cinco minuto sob abrigo da luz. Em seguida foram adicionados 75 mL de água destilada recentemente fervida e resfriada. Também foi preparada uma solução sem a presença de óleo (branco). Após agitação vigorosa, o conteúdo foi titulado com uma solução de tiossulfato de sódio a 0,01 N, em presença de goma de amido. Os cálculos foram realizados de acordo com a fórmula abaixo e os resultados expressos em miliequivalente (mEq) de oxigênio por quilograma (kg) de amostra.

$$IP = [(V - V') \times N \times 1000] \div M$$

Onde:

V= volume de tiossulfato gasto na amostra
V'= volume de tiossulfato gasto no branco
N= normalidade da solução de tiossulfato de sódio
M = massa da amostra (g)

Índice de *p*-anisidina (I*p*A):

Este método é utilizado para a determinação da quantidade de aldeídos nos óleos e gorduras, onde, o I*p*A é definido como 100 vezes a densidade óptica medida numa célula de 1 cm de uma solução contendo 1 g de

óleo em 100 mL da mistura de solvente e reagente conforme a descrição do método. Foram pesados 0,2 a 1,0 grama de óleo em um balão volumétrico de 10 mL e completado o volume com iso-octano. A absorbância desta solução foi medida a 350 nm. Em seguida foi adicionado 5 mL da solução anterior em tubo com rolha esmerilhada, adicionado 1 mL do reagente *p*-anisidina e agitado. Após 10 minutos foi medida a absorbância da solução a 350 nm. Uma solução contendo apenas 5 mL de iso-octano e 1 mL do reagente *p*-anisidina foi utilizada como branco. Os cálculos foram realizados segundo a fórmula abaixo:

$$\mathbf{I}p\mathbf{A} = 25 \times (1{,}2Aa - Ab) \div M$$

Onde:

Aa= absorbância da solução após a reação com a *p*-anisidina

Ab= absorbância da solução inicial

M= massa da amostra (g)

Valor do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA):

Este método parte do princípio de que os produtos de oxidação secundária de óleos e gorduras reagem com o TBA, formando produtos de condensação que são lidos a 530 nm. Foi pesado 100 mg dos óleos em um balão volumétrico de 25 mL e completado o volume com n-butanol. Em seguida, foi transferido 5 mL desta solução para um tubo com tampa e adicionados 5 mL da solução de TBA (2 mg de ácido tiobarbitúrico por mL de n-butanol). Também foi preparada uma solução sem a presença de óleo (branco). Após agitação, a solução foi levada a banho maria a 95°C por 120 minutos. A leitura das absorbâncias das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 530 nm, os cálculos seguiram a fórmula abaixo e os resultados foram expressos como µg de malonaldeído (um aldeído com três átomos de carbono) por g de amostra.

$$\text{Valor de TBA} = [50 \times (A\text{-}B)] \div M$$

Onde:

A= absorbância da solução teste

B= absorbância do branco

M= massa da porção teste (mg)

3.2.4 Estabilidade oxidativa dos óleos

A estabilidade oxidativa dos óleos foi avaliada utilizando três sistemas:

Sistema modelo β-caroteno / ácido linoléico:

O método de co-oxidação de substratos (β-caroteno / ácido linoléico), conforme descrito por Schubert, Lansky e Neeman (1999), baseia-se na oxidação (descoloração) do β-caroteno em uma determinada emulsão, observada em espectrofotômetro. Para o preparo do meio emulsionado, adicionou-se 0,2 mL de solução β-caroteno em clorofórmio (10 mg/10mL), 20 µL de ácido linoléico e 0,5 mL de emulsificador *Tween* 40; misturou-se bem para completa homogeneização e o clorofórmio foi removido com N_2. Posteriormente, foram acrescidos 50 mL de água destilada agitando-se vigorosamente. O meio apresentou-se límpido com absorbância entre 0,6 e 0,7 em 470 nm. Alíquotas de 5 mL desta emulsão foram transferidas para tubo de espectrofotômetro e 2 mL das amostras diluídas em etanol (3,5 mg/10mL) foram acrescentados ao meio. O antioxidante sintético butilhidroxitolueno (BHT) foi utilizado como padrão de referência, na mesma concentração das amostras. Os valores dasabsorbâncias foram obtidos em espectrofotômetro (modelo SPECTRONIC® 20, GENESYS™, Rochester, USA), no período de 120 minutos a intervalos de 15 minutos, enquanto as amostras eram mantidas em banho maria a 50ºC.

Sistema de varredura de radicais livres:

O sistema de varredura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) foi realizado segundo Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995) e Blois (1985) com adaptações. Esta metodologia tem por base a redução do radical DPPH•: ao fixar um H•, removido do antioxidante em estudo, observa-se uma diminuição da absorbância, o que permite calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% o radical DPPH•. Uma alíquota de 0,5 mL, contendo diferentes concentrações de óleos

dissolvidos em n-butanol, foi adicionada a 1,5 mL de solução de DPPH• em butanol (3,0 mg/200mL). Todas as determinações foram acompanhadas de um controle sem as amostras de óleo e com uma substância antioxidante conhecida o BHT. A redução do radical DPPH• foi medida a 517nm em espectrofotômetro (SPECTRONIC® 20 GENESYS™, Rochester, USA) logo após 30 minutos de repouso. O decréscimo nos valores das absorbâncias das amostras foi correlacionado com o controle e estabelecida porcentagem de descoloração do radical DPPH•, isto é, o seqüestro de radicais livres, expresso pela equação:

$$\textbf{\% de proteção} = (Abs_{controle} - Abs_{amostra}) \div Abs_{controle}$$

Modelo Rancimat®:

Este modelo de avaliação da estabilidade lipídica avalia o tempo (período de indução) para autoxidação dos óleos submetidos a condições oxidantes usando um analisador Rancimat® (modelo 743, Metrohm Ltd., Herisau, Suíça) com o software PC 743 Rancimat 1.0 (MÉNDEZ et al., 1996). O princípio da determinação da condutividade no teste Rancimat se baseia na resistência da medição da solução dos ácidos voláteis produzidos. As amostras de óleos (5 g) foram submetidas à oxidação a 110ºC (fluxo de oxigênio 20 L/h). Os períodos de indução - PI (h) foram registrados automaticamente.

3.2.5 Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (n=3). Para comparar o efeito dos dois métodos de esterificação nos teores de ácidos graxos dos óleos (OL e PSO), inicialmente a homogeneidade de variâncias entre grupos foi avaliada pelo teste *F*. Após, o teste *t*-Student para amostras independentes foi aplicado aos pares de dados que mostraram homogeneidade de variâncias, ao passo que o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi aplicado aos dados que não apresentaram homogeneidade de variâncias. O

mesmo procedimento para comparação de médias foi utilizado para avaliar as características de qualidade e estabilidade oxidativados óleos.

Para comparar a estabilidade oxidativa entre os óleos vegetais, em comparação com um antioxidante sintético, o BHT, a homogeneidade de variâncias foi confirmada pelo teste de Hartley / Levene. Diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) univariada, sendo as médias comparadas pelo teste de Fisher (mínima diferença significativa). Todas as análises foram realizadas usando os programas Statistica v.7 (Statsoft, Estados Unidos) e Action v.2.4 (Estatcamp, Brasil).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfil de ácidos graxos nos óleos

Ao analisar ácidos graxos conjugados é importante que o método seja capaz de separar e quantificar estes isômeros geométricos e posicionais, evitando isomerizações adicionais durante todas as etapas de derivatização (CHRISTIE; DOBSON; ADLOF, 2007). A preparação de derivados voláteis é a primeira etapa para analisar o perfil dos ácidos graxos por cromatografia (La FUENTE; LUNA; JUÁREZ, 2006). Este procedimento consiste em transformar os ácidos graxos a partir de glicerídeos em ésteres metílicos. Os métodos de metilação usando $NaOCH_3$ ou KOH em metanol à temperatura ambiente são considerados os mais confiáveis para determinar a distribuição de isômeros de ácidos graxos conjugados porque não causam isomerização. Os métodos de catalização ácida que utilizam BF_3, HCl ou H_2SO_4, favorecem a isomerização de dienos e trienos (SASSANO et al., 2009; CHEN et al., 2007; La FUENTE; LUNA; JUÁREZ, 2006). Entretanto, segundo Kramer et al. (1997), a esterificação utilizando $NaOCH_3$ em metanol não provoca isomerização, mas este método não é eficiente em metilar ácidos graxos livres, portanto uma

combinação com catalizadores ácidos é recomendada para esterificar todos os ácidos graxos e reduzir a formação de isomerização. Diante destas informações, foram realizados testes com as amostras de óleos utilizando os dois métodos de esterificação (mista ealcalina), a fim de confirmar qual a melhor metodologia a ser utilizada para as análises com o PSO. Os cromatogramas referentes à mistura de padrões de metil-ésteres analisados nas três condições testadas: CC 1, CC 2 e CC 3; estão apresentados na Figura II.1. Os cromatogramas das amostras de OL e PSO nas três condições testadas encontram-se em anexo (Anexo 1).

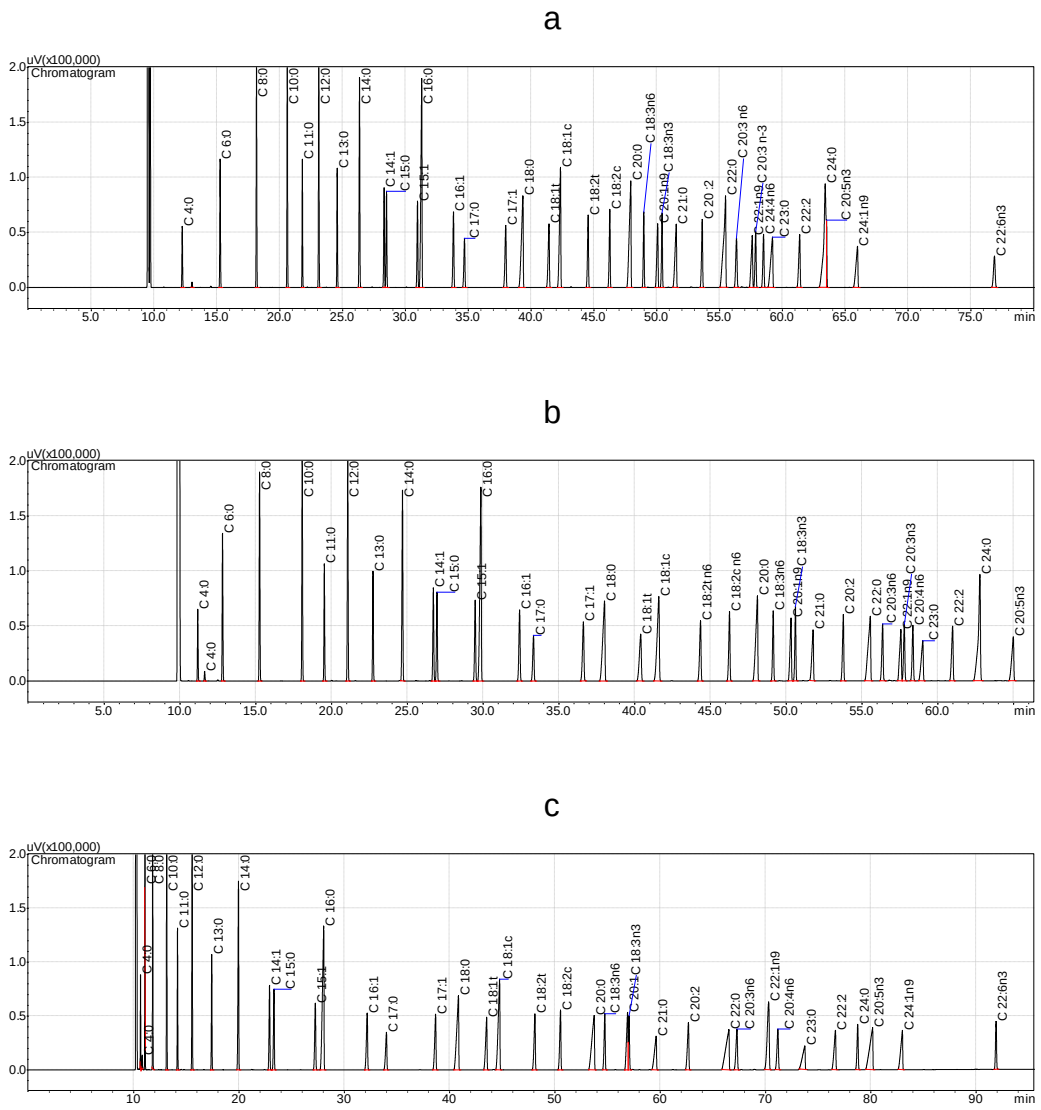


Figura II.1. Cromatogramas correspondentes ao padrão de metil-ésteres (C4-C24) em diferentes condições cromatográficas: (a) CC 1, (b) CC 2 e (c) CC 3.

A condição cromatográfica descrita por Kramer et al. (1997) – CC 1 teve duração de 80 minutos de corrida e resultou em uma boa separação dos ácidos graxos, principalmente os de cadeia curta (encontrados nos 30 primeiros minutos de corrida). A condição descrita por Cordain et al. (2002) – CC 2 mostra uma boa separação de ácidos graxos de cadeia curta, porém o tempo de corrida (~ 66 minutos) não foi suficiente para identificar todos os ácidos graxos presentes no padrão. Os ácidos graxos de cadeia longa, os quais estão em maior concentração no PSO - neste grupo incluem-se também os CLNAs (ácido punícico) – não apresentaram boa separação e o tempo da corrida não é suficiente. Já a condição cromatográfica descrita por Baublits et al. (2007) – CC 3 apresentou uma duração de 93 minutos e resultou em boa separação de todos os ácidos graxos, facilitando a identificação dos picos de ácidos graxos de cadeia longa, e, portanto, mostrou-se ser o método mais adequado para a análise do PSO bem como dos tecidos que provavelmente apresentarão o CLNA (PA) em sua composição. De acordo com Baublits et al. (2007) e Pinheiro (2010), que utilizaram essa programação para identificar o perfil de ácidos graxos de alimentos que continham os isômeros conjugados do ácido linoléico como carnes e leite de ruminantes, consideraram que esta programação proporciona boa separação dos picos de ácidos graxos. Segundo Pinheiro (2010) esta condição cromatográfica, quando comparada com as outras programações (CORDAIN et al., 2002; KRAMER et al., 1997), é a mais adequada porque resulta em boa separação na região dos isômeros dos ácidos oléico e linoléico.

Utilizando a programação CC 3 (Baublits et al., 2007) para a realização dos testes de esterificação (Mista e Alcalina), pode-se observar que os dois métodos resultaram em boa separação dos ácidos graxos para as amostras estudadas. Porém, a esterificação alcalina apresentou um cromatograma com menos picos e isto pode ser devido a sua melhor eficiência em metilar os ácidos graxos sem a ocorrência de isomerização. Isto vai de acordo com alguns autores, que relatam os métodos de metilação usando $NaOCH_3$ ou KOH em metanol como os mais confiáveis para determinar a distribuição de isômeros de ácidos graxos conjugados porque não causam isomerização e reduzem a perda de ácidos graxos de cadeia curta (SASSANO et al., 2009;

CHEN et al., 2007; La FUENTE; LUNA; JUÁREZ, 2006). Os cromatogramas referentes às amostras de PSO e OL utilizando os dois métodos de esterificação encontram em anexo (Anexo 2) e a Tabela II.1 mostra o perfil dos ácidos graxos presentes no PSO e no OL, segundo as duas esterificações.

Tabela II.1. Perfil de ácidos graxos (%) presentes nos óleos de linhaça (OL) e da semente de romã (PSO), utilizando dois métodos de esterificação (mista e alcalina).

Ácidos Graxos	OL			PSO		
	Mista	**Alcalina**	**P-valor**	**Mista**	**Alcalina**	**P-valor**
C16:0	6,03± 0,02	6,06± 0,01	0,10	2,95± 0,01	2,77± 0,00	<0,01
C18:0	5,22± 0,02	5,27± 0,00	0,01	2,57± 0,01	2,42± 0,00	<0,01
C18:1*c* ω-9	21,61± 0,03	21,73± 0,00	<0,01	6,07± 0,02	5,74± 0,01	<0,01
C18:1*c* ω-7	0,72± 0,00	-	NA	0,34± 0,00	-	NA
C18:2*c* ω-6	14,58± 0,00	14,67± 0,00	<0,01	7,73± 0,03	7,29± 0,01	<0,01
C20:0	-	-		0,72± 0,00	0,39± 0,00	<0,01
C20:1*c* ω-9	-	-		0,42± 0,00	0,39± 0,00	<0,01
C18:3*cω*-3	51,85± 0,08	52,37± 0,01	<0,01	0,43± 0,00	0,39± 0,00	<0,01
C21:0	-	-		0,41± 0,00	2,91± 0,00	<0,01
C18:3 9*c*11*t*13*c*	-	-		42,34± 0,67	54,90± 0,03	<0,01
NI	-	-		6,22± 0,05	-	NA
NI	-	-		1,99± 0,05	-	NA
C18:3 9*c*11*t*13*t*	-	-		17,29± 0,16	16,07± 0,01	<0,01
C18:3 9*t*11*t*13*c*	-	-		10,19± 0,43	6,71± 0,00	<0,01
C18:3 9*t*11*t*13*t*	-	-		0,33± 0,00	-	NA

Programação: Baublits et al. (2007). NI = Não identificado; NA = Não se aplica.
Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=3); P-valor (Teste *t*-student).

De acordo com a Tabela II.1, pode-se confirmar que os ácidos graxos majoritários no OL e no PSO foram o ácido α-linolênico (LNA; C18:3 ω-3) e o ácido punícico (PA; C18:3-9*c*,11*t*,13*c*), respectivamente. Os resultados encontrados para o OL estão de acordo com a literatura, que relata a presença de cerca de 50 a 58% de LNA no OL (AKPOLAT et al., 2011; ROSA et al., 2010; TZANG et al., 2009; CINTRA et al., 2006). Rosa et al. (2010) também mostraram que o OL apresenta cinco ácidos graxos em sua composição: C16:0

(6,45%), C18:0 (4,35%), C18:1 ω-9 (18,00%), C18:2 ω-6 (12,71%) e C18:3 ω-3 (58,47%). Já para o PSO, os trabalhos mostram pequenas variações no perfil de ácidos graxos, conforme pode ser observado na Tabela I.1 descrita no Capítulo I (página 13). Valores de PA podem variar de 37% a 81% no PSO e, além disso, outros ácidos graxos trienos conjugados podem ser observados em menores quantidades neste óleo, assim como também foram encontrados neste trabalho (ELEFALLEH et al., 2010; PARASHAR; SINHA; SINGH, 2010; KÝRALAN, GÖLÜKCÜ, TOKGÖZ, 2009; PANDE; AKOH, 2009; JARDINI; MANCINI-FILHO, 2007). Entretanto, podemos observar neste estudo que a catálise com a presença de ácido (mista) provoca conversão do ácido punícico para outros isômeros *cis* / *trans* do CLNA no PSO, com a redução do ácido punícico de 54,9% para 42,3% e com um aumento de todos os outros isômeros presentes, bem como o aparecimento de dois isômeros não identificados. Esta observação também foi relatada por Sassano et al. (2009) ao avaliar o efeito na composição de ácidos graxos do PSO utilizando esses dois métodos de derivatização. Esses autores observaram uma redução de 71,8% para 64,9% do valor do ácido punícico nos processos de catálise básica e ácida, respectivamente, com concomitante aumento nas porcentagens dos ácidos α- e β-eleosteárico e catálpico.

4.2 Conteúdo de tocoferóis e fitosteróis nos óleos

A presença de substâncias apropriadas como ingredientes saudáveis de produtos alimentares (exemplo: tocoferóis) em óleos de sementes é frequentemente relacionada com a abundância relativa de ácidos graxos insaturados, presença a qual representa uma vantagem adicional do ponto de vista nutracêutico (CALIGIANI et al., 2010). Ambos os óleos de linhaça e da semente de romã apresentam alta porcentagem de ácidos graxos insaturados e, portanto, o conteúdo de tocoferóis foi analisado e estão apresentados na Tabela II.2. Os cromatogramas do padrão e das amostras encontram-se em anexo (Anexo 3A).

Tabela II.2. Composição de tocoferóis (mg/100g) dos óleos de linhaça (OL) e da semente de romã (PSO).

Amostra	α-tocoferol	β-tocoferol	γ-tocoferol	δ-tocoferol	Total
OL	0,93 ± 0,01[b]	18,17 ± 1,90[a]	32,96 ± 3,37[b]	1,39 ± 0,01[b]	53,44 ± 5,26[b]
PSO	3,81 ± 0,08[a]	1,03 ± 0,01[b]	153,21 ± 2,44[a]	17,04 ± 1,65[a]	175,09 ± 3,50[a]
P-valor	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Média ± desvio padrão (n=3); P-valor (teste *t*-student).

De acordo com a Tabela II.2 pode-se observar que o PSO apresentou um conteúdo aproximadamente três vezes maior de tocoferóis que o OL. Entretanto, trabalhos mostram valores maiores (~ 300 mg/100g) de vitamina E para o PSO, com predominância do isômero α-tocoferol (ELFALLEH et al., 2011; CALIGIANI et al., 2010), que neste trabalho apresentou-se baixa. Segundo Elfalleh et al. (2011), o PSO proveniente de frutas da Tunísia apresentou mais de 53% do conteúdo totais de tocoferóis na forma de α-tocoferol e concluíram que o PSO contém alta quantidade de tocoferóis que contribuem para a atividade antioxidante do óleo por expressar altos coeficientes de correlação com os ensaios de poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) e capacidade de absorbância do radical oxigênio (ORAC).

De acordo com Mancini-Filho, Takemoto e Aued-Pimentel (2007), os fitosteróis estão presentes em todos os óleos vegetais, compreendem a maior porção insaponificável e a composição é característica de cada tipo de óleo. Os resultados da composição de fitosteróis presentes nos OL e PSO estão apresentados na Tabela II.3 e os cromatogramas referentes às amostras e os padrões encontram-se em anexo (Anexo 3B).

Tabela II.3. Composição de fitosteróis (mg/100g) dos óleos de linhaça (OL) e da semente de romã (PSO).

Amostra	Campesterol	Estigmasterol	β-sitosterol	Outros	Total
OL	66,4 ± 2,4[a]	10,9 ± 0,5	138 ± 4,0[b]	113 ± 3,7[a]	328 ± 10,6[b]
PSO	48,6 ± 1,6[b]	12,3 ± 0,7	374 ± 1,4[a]	104 ± 7,4[b]	539 ± 11,0[a]
P-valor	<0,01	0,05	<0,01	0,01	<0,01

Média ± desvio padrão (n=3); P-valor (teste *t*-student).

O conteúdo total de fitosteróis do PSO também foi maior que o do OL, e sua composição está de acordo com o observado na literatura (CALIGIANI et al., 2010; PANDE; AKOH, 2009), com maior concentração de β-sitosterol.

4.3 Características de qualidade dos óleos

As determinações feitas na análise de óleos e gorduras são geralmente as dos chamados índices, que são expressões de suas propriedades físicas ou químicas dos mesmos e não as porcentagens dos seus constituintes. São estes índices que, juntamente com as reações características, servem para identificação e avaliação da maioria dos óleos e gorduras, sendo o resultado da análise baseado neste conjunto de dados (IAL, 2005). A Tabela II.4 mostra alguns desses índices analisados nas amostras de óleos.

De acordo com as características de qualidade preconizadas pelo Codex Alimentarius (CODEX STAN 210-1999), óleos prensados a frio devem apresentar um valor máximo de 4,0 mg/g de acidez e 15 mEq/kg de peróxido.

De maneira geral, os índices mostram que os óleos utilizados neste estudo encontram-se dentro dos padrões de qualidade e apresentaram um bom estado de conservação.

Tabela II.4. Características de qualidade e estabilidade dos óleos de linhaça (OL) e da semente de romã (PSO).

Amostras	IA (mg/g)	IP (mEg/Kg)	I*p*A	TBA (µg/g)
OL	1,04 ± 0,00[a]	4,40 ± 0,02[a]	0,56 ± 0,33[b]	0,44 ± 0,01[a]
PSO	0,63 ± 0,00[b]	3,34 ± 0,03[b]	4,84 ± 1,01[a]	0,22 ± 0,01[b]
P-valor	<0,01	<0,01	0,01	<0,01

Legenda: IA (índice de acidez); IP (índice de peróxidos); I*p*A (índice de *p*-anisidina); TBA (Valor do ácido 2-tiobarbitúrico). Média ± desvio padrão (n=3); P-valor (teste *t*-student).

4.4 Estabilidade oxidativa dos óleos

A cinética da resposta antioxidante dos óleos estudados no sistema β-caroteno / ácido linoléico, bem como a do antioxidante sintético BHT, todos na concentração de 0,01% estão apresentadas na Figura II.2(a). Na Figura II.2(b) pode-se observar a porcentagem de inibição da oxidação dos óleos estudados frente à indução da oxidação em comparação ao antioxidante sintético BHT. Estes resultados mostram que o OL (4%) apresentou menor estabilidade oxidativa em relação ao PSO (21%) e os dois óleos apresentaram atividade antioxidante bem menor em comparação ao BHT. Schubert, Lansky e Neeman (1999) utilizaram esta mesma metodologia e relataram uma porcentagem de atividade antioxidante de aproximadamente 40% para o PSO obtido por prensagem à frio, sendo esta atividade perto daquela observada para o chá verde. Eles atribuíram a elevada atividade antioxidante tanto à composição de ácidos graxos como à presença de flavonóides.

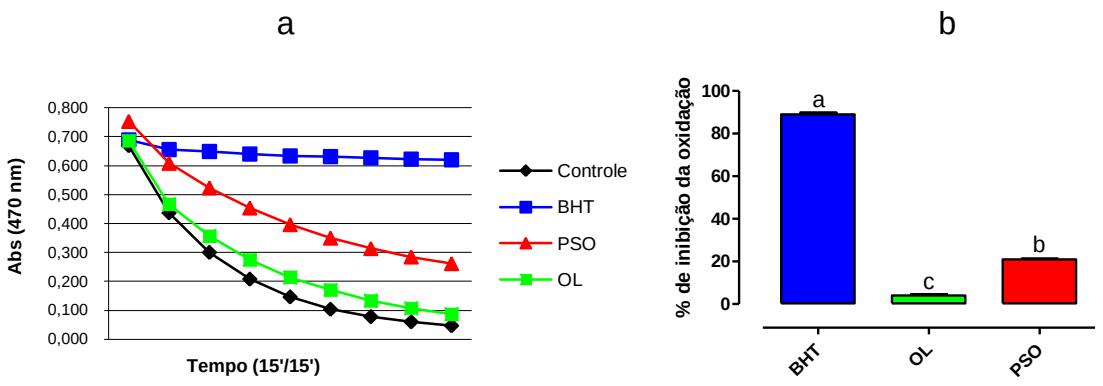


Figura II.2. (a) Cinética de inibição da oxidação dos óleos de linhaça (OL), da semente de romã (PSO) e do BHT na concentração de 0,01% e (b) comparação do percentual de inibição da oxidação pelo sistema β-caroteno / ácido linoléico. One Way ANOVA ($p<0,01$).

A avaliação da estabilidade oxidativa dos óleos de acordo com o método do DPPH• está representada na Figura II.3. De acordo com a figura, o PSO apresentou maior capacidade de varredura do radical DPPH• quando comparado ao OL (a). Entretanto, a porcentagem de redução deste radical pelos óleos comparados ao antioxidante sintético BHT, todos na concentração de 1 mg, foi significativamente menor (b). O IC_{50} é a concentração de inibição capaz de reduzir 50% do radical DPPH•, o PSO apresentou IC_{50} de 3,77 mg enquanto o do BHT foi de 0,26 mg. Neste caso, o IC_{50} mais baixo indica potente antioxidante para agir como varredor do DPPH• (ALI et al., 2012). O OL não apresentou atividade de redução do radical DPPH• nesta concentração.

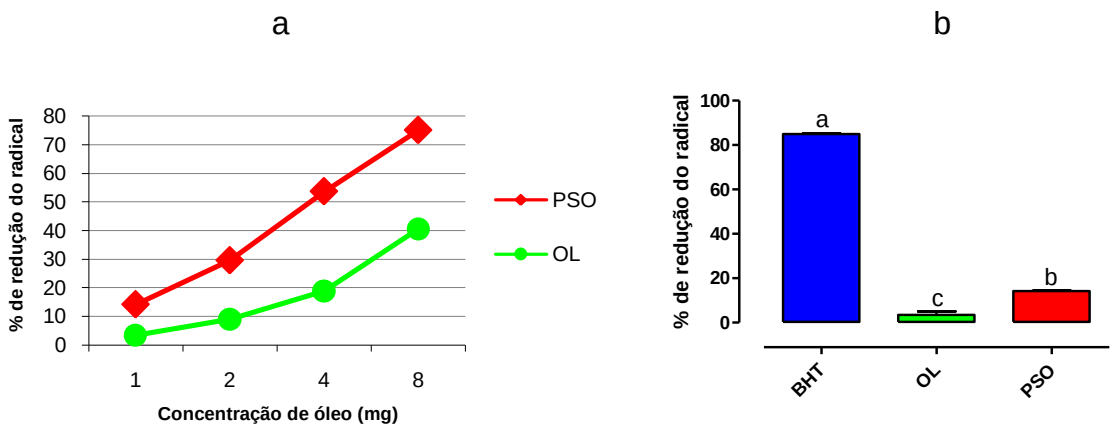


Figura II.3. (a) Redução do radical DPPH• pelos óleos de linhaça (OL) e da semente de romã (PSO) e (b) comparação do efeito na redução do radical de 1mg dos óleos e do BHT. One Way ANOVA ($p<0,01$).

Os ácidos graxos conjugados têm sido relacionados como potentes agentes antioxidantes em organismos animais. Entretanto, a literatura é escassa com relação a atividade antioxidante *in vitro* dos CLNAs, bem como dos óleos ricos nesses compostos. Alguns estudos avaliaram a capacidade do ácido linoléico conjugado (CLA) em varrer o radical DPPH• e mostraram resultados semelhantes aos aqui encontrados para o PSO (ALI et al., 2012; FAGALI; CATALÁ, 2008; YU, 2001). Ali et al. (2012) concluíram em seu estudo que os isômeros de CLAs exibem uma capacidade antioxidante direta considerável e sequestra o radical DPPH• em diferentes concentrações; embora, tenha sido menos efetiva quando comparadas à vitamina E e ao BHT. Outros autores mostraram que o CLA promove proteção contra os radicais livres, mas o seu isômero não conjugado (ácido linoléico) não apresenta a mesma proteção (FAGALI; CATALÁ, 2008; YU, 2001).

Embora tenham existido diferenças nos resultados anteriores, os valores obtidos através da técnica de Rancimat® foram semelhantes para os dois óleos (0,72±0,03 e 0,73±0,07 horas para o OL e PSO, respectivamente). Este resultado confirma que a presença de mais insaturações tanto no OL como no PSO, os tornam mais susceptíveis à oxidação. Segundo Mancini e Mancini-Filho (2005), os ácidos graxos insaturados são estruturas mais suscetíveis ao processo oxidante, pois a presença de carbonos metilênicos

entre as duplas ligações, facilita a retirada de um átomo de hidrogênio e a formação do radical livre, passo inicial da oxidação. Entretanto, neste estudo não foram observadas diferenças na estabilidade oxidativa entre os óleos ricos em ácidos graxos conjugados e não conjugados pelo método Rancimat®. Enquanto que nos sistemas β-caroteno / ácido linoléico e do radical DPPH•, o PSO apresentou-se com mais estabilidade oxidativa. Já Yang et al. (2009) estudaram a estabilidade oxidativa dos isômeros individuais de CLNAs através do teste de consumo de oxigênio realizada ao ar, 50ºC e monitorados pela cromatografia gasosa, comparando a estabilidade oxidativa com seu correspondente não conjugado - LNA, e concluiram que CLNAs são mais suscetíveis a autoxidação do que o LNA. Entre os três grupos de isômeros CLNAs, os isômeros *t,t,t*-CLNA tinham maior estabilidade seguido por *c,t,t*-CLNA e *c,t,c*-CLNA, em ordem decrescente. A estabilidade à oxidação de isômeros geométricos de CLNA em cada grupo foi também dependente da localização das três duplas ligações conjugadas. De acordo com Kinami et al. (2007), a presença de CLNAs podem influenciar a deterioração oxidativa de óleos vegetais. No entanto, os resultados obtidos indicam que o PSO está dentro dos padrões de qualidade, estando a maioria dos índices avaliados abaixo do respectivo óleo rico em ácido graxo não conjugado.

5 CONCLUSÕES

A caracterização das amostras por cromatografia gasosa mostrou que o método de esterificação alcalina e a condição descrita por Baublits et al. (2007), quando comparadas com as outras condições analíticas, são a forma mais adequada para analisar as amostras de óleo da semente de romã (PSO); uma vez que proporcionou menor isomerização dos CLNAs e separação adequada para a identificação de todos os picos, respectivamente. O perfil de ácidos graxos apresentou-se de acordo com a literatura, cujos ácidos graxos majoritários foram o ácido α-linolênico, para o óleo de linhaça (OL), e o ácido punícico, para o PSO. O PSO apresentou maior conteúdo de vitamina E e de

fitosteróis, em comparação ao OL. Estes óleos apresentaram-se dentro dos padrões de qualidade recomendados, apesar de mostrarem baixa estabilidade oxidativa frente ao método Rancimat®. Com este capítulo, conclui-se ainda que o PSO apresenta melhor estabilidade oxidativa, de acordo com os sistemas de cooxidação do β-caroteno / ácido linoléico e de varredura do radical DPPH•, em comparação ao OL.

No geral, os resultados confirmam a presença em altas concentrações do ácido α-linolênico conjugado, da vitamina E e de fitosteróis no óleo da semente de romã e que, apesar de ser um ácido graxo altamente insaturado, não interferiu de maneira significativa na qualidade do óleo. Neste sentido, estudos adicionais são necessários a fim de confirmar o efeito do óleo da semente de romã com esta composição tão característica em diferentes sistemas e sob condições fisiológicas.

6 REFERÊNCIAS

AKPOLAT, M.; KANTER, M.; TOPCU-TARLADACALISIR, Y.; AYDOGDU, N. Protective effect of flaxseed oil on renal injury in hyperlipidaemic rats: the effect of flaxseed oil on hyperlipidaemia. **Phytotherapy Research**, v.25, p.796-802, 2011.

ALI, Y.M.; KADIR, A.A.; AHMAD, Z.; YAAKUB, H.; ZAKARIA, Z.A.; ABDULLAH, M.N.H. Free radical scavenging activity of conjugated linoleic acid as single or mixed isomers. **Pharmaceutical Biology**, v.50, p.712-719, 2012.

ALMEIDA, C.A.S.**Avaliação dos principais fitosteróis em óleos vegetais e azeite**. 2009, 89f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 5th Ed. Champaign, USA, AOCS, 2004.

BAUBLITS, R.T.; POHLMAN, F.W.; BROWN JR., A.H.; JOHNSON, Z.B.; PROCTOR, A.; SAWYER, J.; DIAS-MORSE, P.; GALLOWAY, D.L. Injection of conjugated linoleic acid into beef strip loins. **Meat Science**, v.75, p.84–93, 2007.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.118, p.119-1200, 1985.

BRAND-WILLIANS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.

CALIGIANI, A.; BONZANINI, F.; PALLA, G.; CIRLINI, M.; BRUNI, R. Characterization of a potential nutraceutical ingredient: Pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil unsaponifiable fraction. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.65, p.277-283, 2010.

CHEN, J.; CAO, Y.; GAO, H.; YANG, L.; CHEN, Z.Y. Isomerization of conjugated linolenic acids during methylation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.150, p.136-142, 2007.

CHRISTIE, W.W.; DOBSON, G.; ADLOF, R.O. A Practical Guide to the Isolation, Analysis and Identification of Conjugated Linoleic Acid. **Lipids,** v.42, p.1073-1084, 2007.

CHRISTIE, W.W.; SÉBÉDIO, J.L.; JUANÉDA, P. A practical guide to the analysis of conjugated linoleic acid (CLA). **Inform**, v.12, p.147-152, 2001.

CINTRA, D.E.C.; COSTA, A.G.V.; PELUZIO, M.C.G.; MATTA, S.L.P.; SILVA, M.T.C.; COSTA, N.M.B. Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout, or chicken skin. **Nutrition**, v.22, p.197-205, 2006.

CORDAIN, L.; WATKINS, B.A.; FLORANT, G.L.; KELHER, M.; ROGERS, L.; LI, Y. Fatty acid analysis of wild ruminant tissues: evolutionary implications for reducing diet-related chronic disease. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.56, p.181-191, 2002.

CODEX STAN 210-1999. Codex standard for named vegetable oils codex stan 210-1999. Revisado em 2009. 16p. Acesso em 10/10/12. Disponível em: http://www.codexalimentarius.org/

ELFALLEH, W.; YING, M.; NASRI, N.; SHENG-HUA, H.; GUASMI, F.; FERCHICHI, A. Fatty acids from Tunisian and Chinese pomegranate (*Punica grantum* L.) seeds. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.62, p.200-206, 2011.

FAGALI, N.; CATALÁ, A. Antioxidant activity of conjugated linoleic acid isomers, linoleic acid and its methyl ester determined by photoemission and DPPH• techniques. **Biophysical Chemistry**, v.137, p.56-62, 2008.

IAL - Instituto Adolfo Lutz. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. IV ed. 1018p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

JARDINI, F.A.; MANCINI-FILHO, J. Composição centesimal e perfil dos ácidos graxos de romã (*Punica granatum* L.) cultivada no Brasil. **Higiene Alimentar**, v.21, p.81-85, 2007.

JOHANNINGSMEIER, S.D.; HARRIS, G.K. Pomegranate as a functional food and nutraceutical source. **The Annual Review of Food Science and Technology**, v.2, p.181-201, 2011.

KINAMI, T.; HORII, N.; NARAYAN, B.; ARATO, S.; HOSOKAWA, M.; MIYASHITA, K.; NEGISHI, H.; IKUINA, J.; NODA, R.; SHIRASAWA, S. Occurrence of conjugated linolenic acids in purified soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society** (JAOCS), v.84, p.23-29, 2007.

KRAMER, J.K.G.; FELLNER, V.; DUGAN, M.E.R.; SAUER, F.D.; MOSSOBA, M.M.; YURAWECZ, M.P. Evaluating Acid and Base Catalysts in the Methylation of Milk and Rumen Fatty Acids with Special Emphasis on Conjugated Dienes and Total trans Fatty Acids. **Lipids,** v.32, p.1219–1228, 1997.

KÝRALAN, M.; GÖLÜKCÜ, M.; TOKGÖZ, H. Oil and conjugated linolenic acid contents of seeds from important pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. **Journal of the American Oil Chemists' Society** (JAOCS), v.86, p.985-990, 2009.

La FUENTE, M.A.; LUNA, P.; JUÁREZ, M. Chromatographic techniques to determine conjugated linoleic acid isomers. **Trends in Analytical Chemistry,** v.25, p.917-926, 2006.

MANCINI-FILHO, J.; TAKEMOTO, E.; AUED-PIMENTEL, S. Parâmetros de identidade e qualidade de óleos e gorduras. *In*: ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PENTEADO, M.D.V.C. **Vigilância Sanitária**: tópicos sobre legislação de alimentos. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2007. cap.6, p.81-107.

MANCINI, D.A.P.; MANCINI-FILHO, J. Prevenção de reações oxidativas: antioxidantes nos vegetais de consumo humano. *In*: DE ANGELIS, R. C. **A importância dos alimentos vegetais na proteção da saúde humana**. 2ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2005. cap.36.

MÉNDEZ, E.; SANHUEZA, J.; SPEISKY, H.; VALENZUELA, A. Validation of the rancimat test for the assessment of the relative stability of fish oils. **Journal American Oil Chemistry Society**, v.73, p.1033-1037, 1996.

PANDE, G.; AKOH, C.C. Antioxidant capacity and lipid characterization of six Georgia-grown pomegranate cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.9427-9436, 2009.

PARASHAR, A.; SINHA, N.; SINGH, P. Lipid contents and fatty acids composition of seed oil from twenty five pomegranates varieties grown in India. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v.2, p.12-15, 2010.

PINHEIRO, F.G. **Ácido linoléico conjugado em cortes bovinos e laticínios: avaliação de metodologias analíticas para a quantificação dos isômeros conjugados majoritários**. 2010, 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

ROSA, D.D.; SALES, R.L.; MORAES, L.F.S.; LOURENÇO, F.C.; NEVES, C.A. ; SABARENSE, C.M. ; RIBEIRO, S.M.R. ; PELUZIO, M.C.G. Flaxseed, olive and fish oil influence plasmatic lipids, lymphocyte migration and morphometry of the intestinal of Wistar rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.25, p.275-280, 2010.

SASSANO, G.; SANDERSON, P.; FRANX, J.; GROOT, P.; STRAALEN, J.V.; BASSAGANYA-RIERA, J. Analysis of pomegranate seed oil for the presence of jacaric acid. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.89, p.1046-1052, 2009.

SCHUBERT, S.Y.; LANSKY, E.P.; NEEMAN, I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegrante seed oil and fermented juice flavonoids. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, p.11-17, 1999.

TSUZUKI, T.; IGARASHI, M.; IWATA, T.; YAMAUCHI-SATO, Y.; YAMAMOTO, T.; OGITA, K.; SUZUKI, T.; MIYAZAWA, T. Oxidation rate of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid is slowed by triacylglycerol esterification and α-tocopherol. **Lipids**, v.39, p.475-480, 2004.

TZANG, B.S.; YANG, S.F.; FU, S.G.; YANG, H.C.; SUN, H.L.; CHEN, Y.C. Effects of dietary flaxseed oil on cholesterol metabolism of hamsters. **Food Chemistry**, v.114, p.1450-1455, 2009.

YANG, L.; CAO, Y.; CHEN, J.N.; CHEN, Z.Y. Oxidative Stability of Conjugated Linolenic Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.4212-4217, 2009.

YU, L. Free Radical Scavenging Properties of Conjugated Linoleic Acids. **Journal of Agriculture Food Chemistry,** v.49, p.3452−3456, 2001.

ZOCK, P.L. Health problems associated with saturated and *trans* fatty acids intake. *In*: WILLIAMS, C.; BUTTRISS, J. **Improving the fat content of foods**. Boca Raton: CRC Press, 2006. cap.1, p.3-24.

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO EM RATOS DO EFEITO DO ÓLEO DA SEMENTE DE ROMÃ (Punica grantum L.*) SOBRE O PERFIL LIPÍDICO E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E OXIDATIVOS TECIDUAIS*

RESUMO

O objetivo geral deste capítulo foi avaliar o efeito da suplementação com óleo da semente de romã (PSO), rico em ácido punícico (9*c*,11*t*,13*c*-CLNA), sobre o perfil lipídico e sua influência sobre parâmetros bioquímicos e oxidativos teciduais em ratos saudáveis. O PSO foi fornecido aos animais por via intragástrica nas concentrações 1%, 2% e 4% em relação ao consumo diário da dieta durante 40 dias. Não houve alteração no ganho de peso total dos animais, nos pesos dos tecidos muscular (gastrocnêmio) e adiposos (retroperitonial e epididimal), nos marcadores bioquímicos no soro e de estresse oxidativo nos tecidos. No entanto, os valores de TBARS apresentaram-se reduzidos no cérebro dos animais suplementados com PSO, descando-se que não foram observadas quantidades significativas de ácidos graxos conjugados nesse tecido. Entretanto, o ácido linoléico conjugado (CLAs) esteve presente em todos os outros tecidos estudados, mostrando que o CLNA é metabolizado e incorporado na forma de CLAs e depende da dose oferecida. Apesar disto, não houve qualquer diferença na histologia dos tecidos hepático e muscular. Os resultados obtidos demonstram que o PSO, em animais saudáveis, não provoca alterações no metabolismo lipídico e também não participa do processo de inibição da oxidação.

Palavras chave: ácido punícico, incorporação tecidual, estado oxidativo.

1 INTRODUÇÃO

O interesse nos benefícios à saúde dos ácidos graxos conjugados (AGCs) está aumentando, uma vez que tem sido demonstrado possuírem atividades farmacológicas relevantes para a prevenção e tratamento da aterosclerose, obesidade, câncer e hipertensão (TRAN et al., 2010; CAO et al., 2009). Existem vários estudos que avaliam os efeitos benéficos dos ácidos linoléico conjugados (CLAs) para o organismo, especialmente em modelos experimentais com animais. O foco principal dos trabalhos é a habilidade dos CLAs em reduzir o tecido adiposo, bem como em afetar a massa muscular (KENNEDY et al., 2010; BENJAMIN; SPENER, 2009).

Outro fator que tem chamado atenção é que tem sido mostrado que os CLAs apresentam atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* e que isto poderia ser uma das possíveis explicações para os seus efeitos benéficos à saúde (ELFALLEH et al., 2011; SANTOS-ZAGO; BOTELHO; OLIVEIRA, 2008). No entanto, alguns resultados são controversos e outros mostram até mesmo efeitos adversos. Além disso, os efeitos em seres humanos ainda são questionáveis, e os mecanismos bioquímicos pelos quais os CLAs proporcionam os potenciais efeitos benéficos poderiam produzir alterações metabólicas indesejáveis (ANDREOLI et al., 2009; PARK, 2009). Tem-se ainda observado nos CLAs diferenças dos efeitos/benefícios tanto na associação como entre os seus isômeros isolados, o que pode em parte explicar algum dos resultados inconsistentes obtidos experimentalmente (KENNEDY et al., 2010; GOEDECKE et al., 2009; PARK, 2009).

Embora as informações sobre os efeitos dos ácidos α-linolênico conjugados (CLNAs) sejam ainda mais limitadas e não permitem um consenso em relação aos seus efeitos em organismos animais e humanos, alguns estudos demonstraram que CLNAs têm um efeito citotóxico em cultura de células tumorais humanas (GROSSMANN et al., 2010; IGARASHI; MIYAZAWA, 2005; YASUI et al., 2005), inibe a carcinogênese (TSUZUKI; KAWAKAMI, 2008; KOHNO et al., 2004; TSUZUKI et al., 2004[b]) e altera o metabolismo lipídico em animais (LAM et al., 2008; KOBA; BELURY; SUGANO, 2007; YAMASAKI et al., 2006; YANG et al., 2005). Tem sido constatado

também que diferentes isômeros de CLNAs exercem diferentes atividades biológicas (SUZUKI et al., 2001), mas seus mecanismos de ação ainda não estão bem estabelecidos. Além disso, estudos têm mostrado que CLNAs pode ser metabolizado e incorporado na forma de CLA *in vivo* (YUAN et al., 2009[acf]), sugerindo que os benefícios à saúde dos CLNAs, possam ser devido a formação de CLAs.

O ácido punícico (PA; C18:3-9*c*,11*t*,13*c*) é um dos isômeros dos CLNAs que tem despertado interesse nos últimos anos. No capítulo anterior, foi destacado que ele está presente em alta porcentagem (55%) no óleo da semente de romã (PSO) e que este óleo apresentou-se dentro dos padrões de qualidade e estabilidade recomendados. Segundo Koba, Belury e Sugano (2007), o PSO contém PA como o ácido graxo majoritário dos lipídeos presentes em sua semente e, portanto, o óleo da semente desta planta é fonte adequada para investigar as funções fisiológicas deste isômero do CLNA. Diante das informações limitadas e muitas vezes contraditórias, a obtenção de mais dados sobre a função dos CLNAs, bem como dos seus isômeros isolados, no organismo animal se torna necessária (CARVALHO; MELO; MANCINI-FILHO, 2010). Além disso, os efeitos fisiológicos e mecanismos de ação do ácido punícico ainda não têm sido bem caracterizados (NEMER, 2009). Neste capítulo, será abordado o efeito da suplementação com PSO em diferentes doses no organismo de ratos saudáveis.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação com óleo da semente de romã, rico em ácido punícico (9*c*,11*t*,13*c*-CLNA), sobre o perfil lipídico e sua influência sobre parâmetros bioquímicos e oxidativos teciduais em ratos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Investigar o efeito da suplementação com o óleo da semente de romã sobre o ganho de peso e os parâmetros bioquímicos no soro de ratos;
- ✓ Avaliar o índice de incorporação do ácido punícico e de seus metabólitos em tecidos de ratos suplementados com óleo da semente de romã, bem como a morfometria dos tecidos hepático, muscular e adiposo;
- ✓ Analisar a influência do óleo da semente de romã no processo de inibição da oxidação tecidual, através da medida de produção das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutationa peroxidase) em tecidos de ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

A amostra de óleo da semente de romã (PSO – *Pomegranate seed oil*) foi obtida por importação direta junto à empresa *Green Source Organics* (Boynton Beach, USA). O produto foi obtido por prensagem a frio das sementes de romã, sendo constituído principalmente de ácido α-linolênico conjugado (ácido punícico). Também foram utilizadas amostras de óleo de linhaça (OL) obtido por prensagem a frio, fornecidas pela empresa Vital Âtman (Uchoa, Brasil), para que se pudesse comparar o efeito do PSO com outro óleo cujo ácido graxo majoritário é o análogo não conjugado do ácido punícico (PA), o ácido α-linolênico (LNA).

Assim que recebidas, as amostras de PSO e OL foram transferidas para pequenos frascos âmbar (com volumes de 20 mL e 50 mL), previamente higienizados e desengordurados. As amostras foram submetidas à atmosfera

de nitrogênio, seladas, identificadas e armazenadas em freezer -20°C. Diariamente um frasco de cada óleo era descongelado à temperatura ambiente para serem fornecidos aos animais.

Para avaliar o efeito do PSO e do OL *in vivo* foram utilizados ratos (*Rattus novergicus*, var. albinus) machos da linhagem Wistar, recém-desmamados, pesando entre 50 e 70 gramas, provenientes do Biotério de Criação e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) e do Instituto de Química (IQ) da Universidade de São Paulo (USP). Foi oferecida aos animais uma dieta comercial balanceada (Nuvilab CR-1, descontaminada e irradiada a 12 KGy), fornecida pelo biotério e cujo laudo está apresentado em anexo (Anexo 4). Foi realizada a análise do perfil de ácidos graxos presentes na ração comercial oferecida aos animais por meio de cromatografia gasosa, conforme descrito no item *3.2.3* deste capítulo.

3.2 Métodos

3.2.1 Ensaio biológico

Os procedimentos descritos abaixo foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da FCF da USP, por estarem de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), conforme mostra o certificado em anexo (Anexo 5).

Foram utilizados 56 ratos, mantidos em gaiolas de plástico (quatro animais em cada) em uma sala com temperatura controlada e fotoperíodo (ciclo claro/escuro) de 12 horas, recebendo dieta e água *ad libitum* durante todo o período experimental. Os animais foram distribuídos, de acordo com o peso inicial (de forma que as médias de peso entre os grupos fossem a mesma), em sete grupos de oito animais cada: grupo controle (recebeu água); três grupos experimentais que receberam OL (fonte de LNA) nas concentrações de 1%, 2% e 4%; e três grupos experimentais que receberam

PSO (fonte de CLNA) nas concentrações de 1%, 2% e 4% em relação ao consumo diário de dieta.

Após um período de aclimatação de sete dias, os animais reberam a suplementação com os óleos experimentais, via intragástrica utilizando-se seringas descartáveis de 3 mL e agulha de gavagem. Para o cálculo do consumo médio diário de dieta, foi fornecido 300 g de ração por gaiola, diariamente as sobras de ração foram pesadas para calcular a ingestão diária e a partir deste cálculo foi estipulada a suplementação de acordo com o consumo e a porcentagem de óleo a ser oferecida. Após a pesagem, a quantidade de ração era completada para 300 g. Semanalmente os animais foram pesados para calcular o ganho de peso o coeficiente de eficácia alimentar (CEA) foi obtido de acordo com a seguinte relação: Ganho de peso do animal (g) ÷ Consumo de ração (g).

No 30º dia de suplementação, os animais foram avaliados quanto ao teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Após jejum de oito horas, uma amostra de sangue foi retirada da veia caudal de cada rato (tempo 0), que na sequência recebeu, via gavagem, uma solução de dextrose (Atlética, pureza de 99,5%) na concentração de dois gramas de dextrose por quilograma de peso (FREIRE et al., 2008). Para preparar 40 mL de solução a 20% foram pesados 8,2 g de dextrose em qsp 40mL de água milliq. As amostras de sangue foram coletadas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos. A dosagem glicêmica foi realizada utilizando-se o glicosímetro Accu-Chek Performa (Roche®).

Após 40 dias de tratamento, os animais foram anestesiados com injeção intraperitonial de uma mistura de cetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), dose recomendada pelo Biotério de Criação e Experimentação da FCF / IQ da USP, e eutanasiados. Foi coletada amostra de sangue pela artéria aorta abdominal, centrifugada a 3.500 rpm por 15 minutos a 4ºC e o soro obtido foi armazenado a –80ºC até o momento das análises. O fígado foi perfundido através da injeção de solução de NaCl 0,9% pela veia porta e após a perfusão o tecido hepático foi coletado, bem como o cérebro, coração e rim, e foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a –80ºC até o momento das análises. O músculo gastrocnêmio e os tecidos adiposos (retroperitoneal e epididimal) também foram coletados, pesados e em seguida

congelados em nitrogênio líquido e armazenados a –80ºC até o momento das análises.

3.2.2 Parâmetros bioquímicos no soro

As análises de lipidograma no soro, constituídas das medidas de triglicerídeos (TG), colesterol total (CT) e lipoproteína de alta densidade (HDL-C); assim como a análise de glicose (G) e das enzimas marcadoras de dano hepático, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), foram avaliadas por meio de *Kits* laboratoriais (Labtest®, Lagoa Santa, Brasil). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em média ± desvio-padrão.

3.2.3 Perfil de ácidos graxos nos tecidos

Os lipídeos dos tecidos foram extraídos segundo o método descrito por Folch, Lee e Stanley (1957), onde foram pesados cerca de um grama de amostra a qual foram adicionados 5 mL de metanol e homogeneizados por um minuto. Em seguida, foram adicionados 10 mL de clorofórmio e homogeneizados por mais 2 minutos. A mistura obtida foi filtrada a vácuo e coletada em *kitassato*. O resíduo contido no filtro foi então homogeneizado novamente com 15 mL da solução clorofórmio : metanol (2:1) por 3 minutos e novamente filtrado. Em seguida, o resíduo contido no filtro foi lavado com 10 mL de clorofórmio e 5 mL de metanol. O filtrado contido no *kitassato* foi então transferido para uma proveta e o volume foi medido para acréscimo de 1/4 de cloreto de potássio (KCl 0,88%). A mistura foi agitada manualmente e a fase superior foi aspirada. O volume residual foi aferido para adicionar 1/4 da solução metanol : água (1:1). Após agitação, a fase superior foi aspirada e a solução restante foi filtrada em sulfato de sódio. O solvente foi evaporado em rotaevaporador sob vácuo a 35ºC. A fração lipídica foi então ressuspendida em

2 mL de clorofórmio e transferido para tubos de esterificação e o solvente foi evaporado com nitrogênio gasoso.

Os ácidos graxos foram transformados em ésteres metílicos de acordo com o método de esterificação alcalina [utilizando métoxido de sódio ($NaOCH_3$) em metanol] proposto por Christie, Sébédio e Juanéda (2001) e foram então injetados no cromatógrafo gasoso [CG - marca Shimadzu, modelo 2010, com detector de ionização de chama e coluna de sílica fundida (100 m e 0,25 mm de diâmetro interno / SP-2560)] seguindo a programação descrita por Baublits et al. (2007). Essas metodologias de esterificação e programação para CG foram selecionadas a partir dos resultados obtidos nos ensaios com os OL e PSO, utilizando duas metodologias de esterificação (mista e alcalina) e três diferentes programações, conforme apresentadas no capítulo II. A identificação dos ácidos graxos foi realizada com base na comparação com os tempos de retenção relativos à mistura de padrões de metil-ésteres C4:0 a C24:0 (Sigma 18919), PUFA-2 (Sigma 47015-U) e de CLAs (Sigma O5632 e 16413). Os cromatogramas referentes aos padrões de CLAs podem ser observados no Anexo 6. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão das porcentagens dos ácidos graxos presentes.

3.2.4 Morfometria dos tecidos hepático, muscular e adiposo

Um pequeno fragmento do tecido hepático e o músculo gastrocnêmio de quatro animais de cada grupo foram coletados e imediatamente fixados em formalina (4%). Seções de (5 µm) foram preparadas e então, coradas com hematoxilina-eosina (HE) para observações fotomicroscópicas.

As fibras musculares foram analisadas pela quantificação da área e do diâmetro de 100 fibras, obtidas aleatoriamente no tecido muscular de cada animal. A obtenção das imagens foi realizada pela câmera Cool SNAP-Pro*cf (Média Cybernetics Inc)* acoplada a microscópio Nikon Eclipse-E800. As medidas foram feitas em aumento de 400 vezes (objetiva de 40x), com auxílio de sistema computadorizado de imagens Image-Pro Plus, versão 4.5 *(Média Cybernetics Inc)*. Foram calculados a área e o diâmetro médios por animal e a

partir destes valores, as médias e os desvios padrão finais, considerados como representativos de cada grupo.

Também foi coletado um pequeno fragmento do tecido adiposo epididimal de quatro animais de cada grupo e os adipócitos isolados mediante a técnica de digestão do tecido pela colagenase, descrita por Rodbell (1964), com algumas modificações (LIMA et al., 1998). O coxin adiposo foi picado com tesoura em finos fragmentos e incubados em tampão digestivo (DMEM, HEPES 20 mM, BSA 4%, colagenase II – Sigma® - 1,0 mg/mL, pH 7,45) por cerca de 30 minutos a 37°C em banho maria com agitação orbital (150 rpm). Em seguida, a amostra foi filtrada em peneira plástica com malha fina (que retém restos teciduais e vasos não digeridos) e lavada por três vezes com 25 mL de tampão (tampão EHB – sais de EARLE, HEPES 20 mM, BSA 1%, piruvato de sódio 1 mM, sem glicose, pH 7,45) mantido a 37°C. Para a análise morfométrica, alíquotas de suspensão celular foram avaliadas em microscópio óptico (aumento de 100x) com ocular graduada para medição de diâmetro celular. Em cada preparação, admitindo-se que o adipócito isolado é esférico, foi medido o diâmetro de 100 células, com auxílio de sistema computadorizado de imagens Motic Images-Plus, versão 2.0. Foi calculado o diâmetro (µm) celular médio por animal e a partir destes valores, as médias e os desvios padrão finais, considerados como representativos de cada grupo.

3.2.5 Homogeneizados dos tecidos e quantificação das proteínas

O tecido hepático dos animais foram pesados e homogeneizados, em homogeneizador tipo ultra-turrax (modelo T10 basic, marca IKA), com um volume de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 igual a três vezes o valor absoluto da massa da amostra pesada. Enquanto o músculo, cérebro e rim foram homogeneizados com um volume de tampão quatro vezes o valor absoluto da massa e o coração, com um volume de apenas duas vezes. Os homogeneizados foram centrifugados a 3.500 rpm por 20 minutos à temperatura de 4ºC, a maior parte do sobrenadante foi empregado na avaliação da lipoperoxidação. Um volume de 1 mL do sobrenadante foi

novamente centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos à 4ºC e o novo sobrenadante gerado foi empregado na determinação da atividade das enzimas antioxidantes. Os homogeneizados obtidos foram mantidos em microtubos *eppendorf*, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a –80ºC até o momento das análises.

A determinação do conteúdo de proteínas presente nos homogeneizados dos tecidos foi realizada em triplicata, segundo o método de Bradford (1985), obtendo-se as leituras no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro (SPECTRONIC® 20 GENESYS™, Rochester, USA). A quantidade de proteína das amostras foi calculada a partir da curva-padrão utilizando albumina de soro bovino (Sigma A4503).

3.2.6 Peroxidação lipídica

A determinação da peroxidação lipídica nos tecidos foi realizada através da medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizando-se o método descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979) com pequenas adaptações. Foi tomado 200 µL do soro ou dos homogeneizados dos tecidos e adicionados 350 µL da solução de ácido acético (20% / pH 3,5) e 600 µL de TBA (0,8% dissolvido em ácido acético - 20% / pH 3,5). A mistura foi aquecida em banho maria a 85ºC por uma hora. Após resfriamento, foi acrescentado 50 µL de dodecil sulfato de sódio a 8,1% e agitados em vortex. Em seguida, o material foi centrifugado a 11.000 rpm por 15 minutos, a camada superior foi removida e sua absorbância medida a 532 nm em espectrofotômetro (SPECTRONIC® 20 GENESYS™, Rochester, USA). Para obtenção dos cálculos foi feita uma curva padrão com 1,1',3,3'-Tetraetoxipropano (TEP - $10x10^{-5}$mol/L) e os resultados foram expressos em nmol de TBARS por mg de proteína.

3.2.7 Atividade das enzimas antioxidantes

Superóxido Dismutase (SOD): a atividade da SOD foi avaliada de acordo com a metodologia de McCord e Fridovich (1969), que verifica a produção dos ânios peróxidos produzidos pela xantina oxidase em presença da xantina. O ânion superóxido reduz o citocromo C e esta redução é medida pelo aumento da densidade ótica a 550 nm numa temperatura a 25ºC. O volume de xantina oxidase a ser utilizado na reação é determinado em um branco, na ausência da SOD, desta maneira obtendo-se uma variação na absorbância a 550 nm entre 0,0250 a 0,0300 por minuto. O meio de reação foi composto por citocromo C 100 μM, xantina 500 μM, EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 1 mM e cianeto de potássio 200 μM em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,8. Em cubetas de quartzo, foram adicionados 1 mL do meio, a xantina oxidase (volume encontrado no branco) e 15 μL da fração citosólica de cada tecido (homogeneizados). A medição foi feita em duplicata. Os resultados foram expressos em unidades por miligrama de proteína (U/mg). Entende-se por uma unidade (U) a atividade da enzima que promove 50% de inibição da reação da xantina a 25ºC em pH 7,8.

Catalase (CAT): a CAT propicia a oxidação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a H_2O e O_2. A metodologia empregada foi descrita por Beutler (1975), quantificando a velocidade de decomposição do H_2O_2 pela enzima mediante o decréscimo da densidade ótica a 230 nm (coeficiente de extensão molar 0,0071 $nM^{-1}.cm^{-1}$) a 37ºC. O meio de reação é composto por H_2O_2 10 mM (10 μL de peridrol 30% em 10 mL de H_2O milliq) e tampão Tris HCl 1 M EDTA 5 mM pH 8,0. Para a reação, foram adicionados 20 μL do homogeneizado a 980 μL do meio, incubados a 37ºC e realizadas leituras das absorbâncias a cada um minuto durante seis minutos. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade (U) da catalase corresponde a atividade da enzima que realiza a hidrólise de 1 μmol de H_2O_2 por minuto a 37ºC em pH 8,0.

Glutationa Peroxidase (GPx): a atividade da GPx foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Sies (1979). Este método fundamenta-se na medição do decaimento da densidade óptica, a 340 nm, promovido pela oxidação do NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) a 30ºC (coeficiente de extinção molar igual a 6,22 $nM^{-1}.cm^{-1}$) durante a redução da glutationa oxidada (GSSG) catalisada pela glutationa redutase (GR). O meio de reação contém glutationa reduzida (GSH) 1 mM, GR 0,1 U/mL, NADPH 20 mM, EDTA 5 mM pH 7,0 e tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0. Foi tomado 1 mL deste meio, acrescentou-se 10 μL de cada amostra (em duplicata) e 10 μL de peróxido de terc-butila 0,5 mM. A solução foi incubada a 30°C e as leituras realizadas a cada minuto num período de seis minutos. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade (U) da enzima foi definida como atividade da enzima que oxida 1 μMol de NADPH por minuto a 30ºC em pH 7,0.

3.2.8 Análise estatística

Análise Estatística Univariada: para comparação entre grupos controle, suplementados com OL (grupo LNA) e suplementados com PSO (grupo CLNA), inicialmente a homogeneidade de variâncias, para variável de resposta, foi checada pelo teste de Hartley / Levene. Em seguinda, a análise de variância (ANOVA) unifatorial foi aplicada para verificação de diferenças entre grupos e o teste de Fisher de mínima diferença significativa foi utilizado para verificar diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) entre as médias. Quando os dados não se mostraram homocedásticos, o teste de Welch seguido do teste de comparação múltipla de Kruskal-Wallis foram aplicados no intuito de avaliar diferenças estatísticas entre as médias de cada grupo. Valores de probabilidade (p-valor) abaixo de 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Todas as variáveis de respostas também foram avaliadas utilizando a análise de correlação linear de Pearson (r) e o valor-p para cada coeficiente foi fornecido. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

Análise Estatística Multivariada: Com o intuito de verificar associações entre as características do perfil lipídico e glicose séricos e o estado antioxidante dos ratos incluídos nos grupos controle, LNA e CLNA, a Análise por Componentes Principais (ACP) e a Análise Hierárquica de Agrupamentos (AHA) foram aplicadas aos dados previamente auto-escalados, de acordo com os métodos preconizados por Correia e Ferreira (2007) e Souza e Poppi (2012). Neste estudo, a ACP e a AHA foram utilizadas, também, para visualizar melhor os resultados obtidos experimentalmente, uma vez que há muitas variáveis de resposta envolvidas no processo de avaliação de funcionalidade dos óleos de linhaça e da semente de romã.

A ACP visa reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados original, preservando a maior quantidade de informação (variância) possível. A ACP foi usada para separar os grupos de ratos tratados com OL (n=3) e PSO (n=3), além de um controle do experimento, de acordo com os resultados médios de cada grupo para cada variável de resposta (n=26). A análise se baseou em correlações lineares e as variâncias foram computadas como SS / (n-1). Autovalores acima de 1,0 foram usados para explicar a projeção dos indivíduos no fator-plano (PC1 x PC2).

A AHA foi utilizada para enfatizar a formação de grupos com características semelhantes, de acordo com variáveis de resposta pré-selecionadas. Os resultados são dispostos em um espaço bidimensional (dendrograma) e amostras (grupos controle, LNA e CLNA) são dispostas de uma maneira mais simples para interpretação de todos os resultados utilizados. A AHA foi aplicada usando o método de aglomeramento de Ward e distâncias Euclidianas foram usadas como métrica para a geração de um dendrograma para os grupos-teste.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Consumo de ração, ganho de peso e peso dos tecidos

Na Tabela III.1 está apresentada a composição de ácidos graxos presente na ração comercial consumida pelos animais durante todo o período experimental, onde pode se observar que os ácidos linoléico (51,7%) e oléico (27,2%) são os majoritários.

A Figura III.1 mostra a evolução do peso dos animais por semana durante os 40 dias de experimento e os resultados de ingestão alimentar, ganho de peso corpóreo e CEA estão apresentados na Tabela III.2.

Tabela III.1. Perfil de ácidos graxos (AGs) presentes na ração comercial (Nuvilab CR-1) oferecida aos animais.

AGs	Nome	%
C 16:0	Ácido palmítico	12,8 ± 0,0
C 18:0	Ácido esteárico	2,8 ± 0,1
C 18:1*c* (ω-9)	Ácido oléico	27,2 ± 0,0
C 18:2*c* (ω-6)	Ácido linoléico	51,7 ± 0,1
C 18:3 (ω-6)	Ácido γ-linolênico	0,4 ± 0,0
C 18:3 (ω-3)	Ácido α-linolênico	4,0 ± 0,0
C 20:3 (ω-3)	Ácido eicosatrienóico (11,14,17)	0,4 ± 0,0
C 24:0	Ácido lignocérico	0,2 ± 0,0
C 22:6 (ω-3)	Ácido docosahexaenóico (4,7,10,13,16,19)	0,4 ± 0,1

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=4).

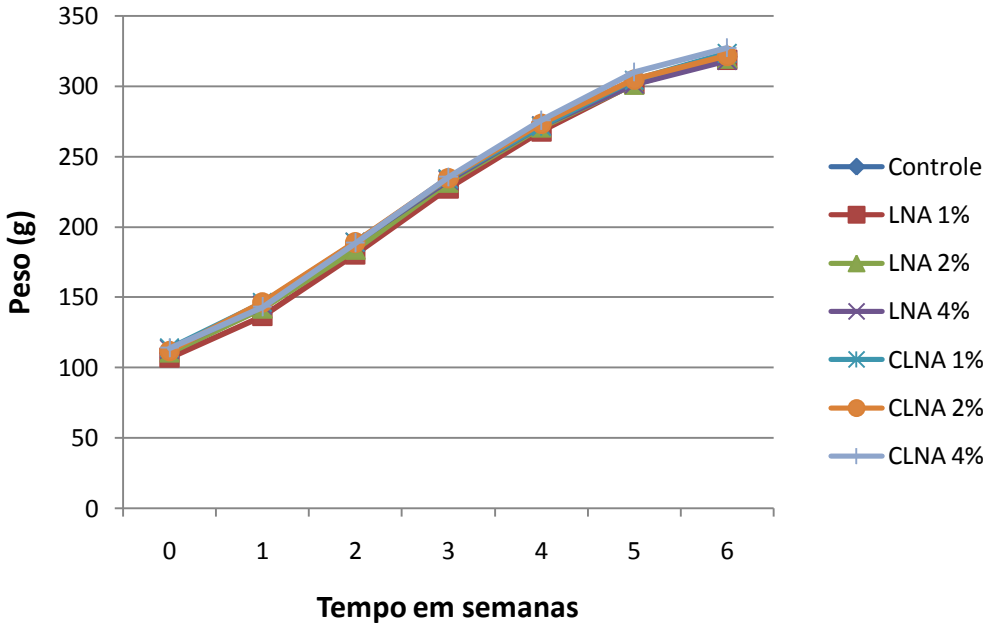


Figura III.1. Ganho de peso semanal dos animais suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias.

Tabela III.2. Ingestão alimentar total, ganho de peso corpóreo e coeficiente de eficácia alimentar (CEA) de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias.

Grupos	Ingestão alimentar total (g)	Ganho de peso corpóreo (g)	CEA
CONTROLE	1023 ± 40[a]	211 ± 13	0,21
LNA 1%	968 ± 46[abc]	212 ± 14	0,22
LNA 2%	971± 7[abc]	209 ± 23	0,22
LNA 4%	884 ± 2[c]	205 ± 22	0,23
CLNA 1%	1035 ± 26[a]	209 ± 17	0,20
CLNA 2%	1000±73[ab]	210 ± 16	0,21
CLNA 4%	926± 11[bc]	213 ± 23	0,23

Resultados expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (p=0,04).

A suplementação com OL e PSO reduziu significativamente a ingestão alimentar total nos grupos suplementados com a dose de 4%, mas não existiu diferença significativa entre os grupos para o ganho de peso total dos animais. Este resultado pode ser explicado pela quantidade de calorias consumida pelos animais que, somando às calorias provenientes do consumo da ração comercial oferecida *ad libitum* (laudo em anexo) com as calorias da quantidade de óleo oferecida, não foram observadas diferenças entre os grupos como pode ser visto na Figura III.2(b).

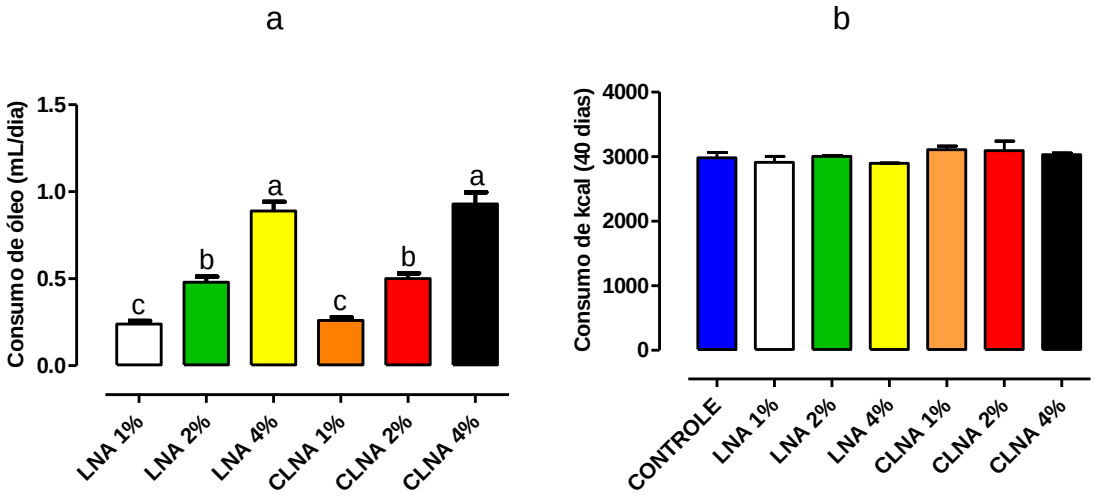


Figura III.2. (a) Consumo médio diário ($p<0,01$) dos óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) e (b) consumo total de calorias durante 40 dias.

Os resultados dos pesos do músculo gastrocnêmio, tecido adiposo retroperitonial e tecido adiposo epididimal estão apresentados na forma de porcentagem em relação ao peso corpóreo total dos animais, e mostram que a suplementação tanto com OL como com PSO, em todas as concentrações utilizadas, não afetam estatisticamente o peso desses tecidos (Figura III.3).

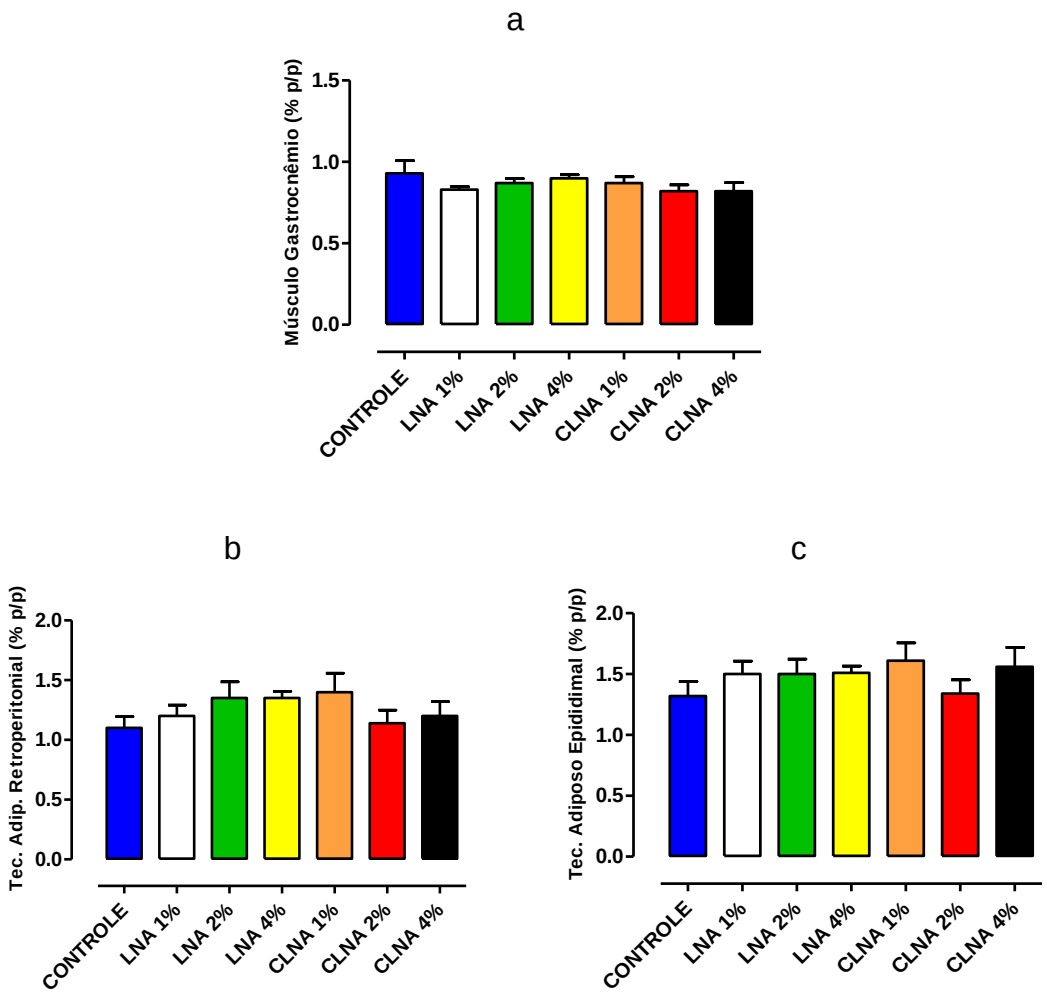


Figura III.3. (a) Porcentagem dos pesos do músculo gastrocnêmio, (b) tecido adiposo retroperitonial e (c) tecido adiposo epididimal em relação ao peso corpóreo total (% p/p) dos animais suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias.

Os ácidos graxos conjugados são comumente divulgados como potentes redutores do tecido adiposo, além de aumentar a massa magra corpórea (McFARLIN et al., 2009; YUAN et al., 2009[f]; KOBA; BELURY; SUGANO, 2007; KOBA et al., 2007; ARAO et al., 2004[ab]) e, portanto, diversos trabalhos foram realizados visando a alteração do peso corpóreo dos animais que consumiram CLNAs. Entretanto, os estudos relatam resultados controversos sobre o papel dos CLNAs no ganho de peso e composição corporal. Koba et al. (2002) avaliaram como CLNAs afetaram a gordura corporal em ratos e concluíram que a alimentação com CLNAs resultou em

redução no peso do tecido adiposo. Em contraste, a suplementação com 1% de CLNAs (PA e/ou α-ESA= ácido α-eleosteárico C18:3-9*c*,11*t*,13*t*) por seis semanas não afetou significativamente a ingestão de alimentos, pesos corporal e de tecidos em camundongos (YUAN et al., 2009[df]). Yamasaki et al. (2006) relataram que o peso corporal e o tecido adiposo não foram afetados em camundongos alimentadas com dietas experimentais contendo 0,12 e 1,2% de PSO, rico em PA por três semanas. Arao et al. (2004[a]) mostrou que o consumo de uma dieta suplementada com óleo de cártamo 9% e 1% PSO por duas semanas, não afetou o peso do tecido adiposo abdominal branco em ratos Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF- Ratos hiperglicêmicos espontaneamente de longo prazo com complicações diabéticas). No entanto, Koba et al. (2002) mostrou que CLNAs reduziu o peso do tecido adiposo perirenal em maior medida quando comparado com o LA, LNA e CLA em ratos. O mesmo grupo demonstrou que a suplementação com PSO diminuiu o peso do tecido adiposo perirenal em camundongos de maneira dependente da dose após quatro semanas de alimentação (KOBA et al., 2007).

Em contrapartida, Nemer (2009) relatou que camundongos alimentados com 2% de PA apresentaram maior ganho de peso corpóreo e maior coeficiente de eficiência alimentar quando comparados aos animais alimentados com 1% de PA e com a dieta controle durante 16 semanas. Além disso, os animais alimentados com 1% e 2% de PA apresentaram menor massa muscular (quadrícepes) quando comparado ao grupo controle, mas não foi observada diferença para o peso do tecido adiposo epididimal.

4.2 Parâmetros bioquímicos do soro

4.2.1 Teste oral de tolerância à glicose e glicemia de jejum

Uma vez que os estudos relatam que os ácidos linoléico conjugados (CLAs) agem como moduladores da homeostasia da glicose e que os CLNAs são metabolizados a CLAs, podendo, portanto exercer os mesmos efeitos no

organismo (HONTECILLAS et al., 2009; McFARLIN et al., 2009; NEMER, 2009; HONTECILLAS et al., 2008), foi realizado o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) bem como a glicemia de jejum nos animais estudados. Os resultados mostraram que a suplementação com OL e PSO não alterarou o metabolismo da glicose nos animais, conforme pode ser observado na Figura III.4.

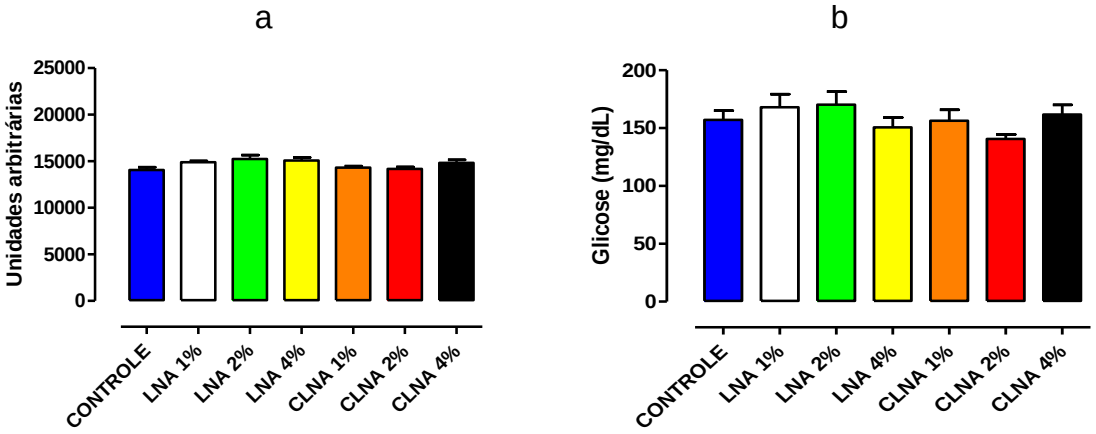


Figura III.4. (a) Teste Oral de Tolerância à Glicose e (b) Glicemia de jejum dos animais suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias.

Nossos achados estão de acordo com as observações de Koba et al. (2007), cuja suplementação com PSO não alterou os níveis de glicose e insulina em camundongos após quatro semanas de tratamento. Dhar et al. (2006) relataram que a suplementação com CLNAs não melhorou a glicemia em ratos com diabetes *mellitus* induzido por alloxan. McFarlin et al. (2009) mostraram que a suplementação com PSO (média de 1,72 mg/g de peso por dia) durante 14 semanas não alterou os níveis de glicose em jejum dos animais; porém, melhorou a sensibilidade à insulina dos camundongos. Já Hontencillas et al. (2008) mostraram em camundongos que a suplementação com ácido catálpico (1% em relação a dieta), um outro isômero do CLNA (C18:3-9*t*11*t*13*c*), durante 28 dias melhorou a concentração de glicose em jejum e a habilidade para normalizar a concentração de glicose plasmática, de acordo com o teste de tolerância à glicose. Entretanto, os autores assumem um conflito de interesse uma vez que os resultados foram usados como arquivo

para aplicação de patente. Nemer (2009) também relata melhora na sensibilidade à insulina pela suplementação de camundongos com 1% de PA. Entretanto, não foram observados efeitos nas concentrações séricas de insulina e glicose, nem na sensibilidade à insulina, de humanos suplementados durante 28 dias com sementes de *Trichosanthes kirilowii* Maxim, ricas em PA (YUAN et al., 2009[c]). Mais recentemente, Vroegrijk et al. (2011) mostraram que uma dieta contendo 1% de PSO durante 12 semanas não alterou a concentração de glicose e insulina de camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica. Entretanto, os autores concluíram também que a suplementação com PSO melhora a resistência a insulina e a obesidade induzida pela dieta, mostrando evidências de que o PSO aumenta a capacidade oxidativa de carboidratos e, portanto, melhora a sensibilidade à insulina periférica sob condições de dieta hiperlipídica em camundongos.

4.2.2 Lipidograma e transaminases no soro

Não existiram diferenças estatisticamente significantes nas concentrações séricas de TG e HDL-C entre os grupos e nem nas concentrações de CT nos animais suplementados com PSO em relação ao controle. Entretanto, foi observada uma redução do CT para os animais suplementados com OL 2% e 4% em relação ao controle (Figura III.5). Este resultado está de acordo com a literatura, que já vem mostrando o efeito hipocolesterolemiante do óleo de linhaça devido a sua composição em ω-3 (AKPOLAT et al., 2011; TZANG et al., 2009). Yang et al. (2005) também mostraram que o LNA mas não seus isômeros conjugados (PA e α-ESA) é hipocolesterolemiante em hamsters. De acordo com Lam et al. (2008), este efeito é explicado, pelo menos em parte, pela inibição mais eficiente do LNA na atividade da acil-CoA colesterol acil transferase (ACAT) intestinal de hamsters. A esterificação do colesterol no intestino é catalisada pela ACAT, portanto, esta enzima é um componente limitante na absorção do colesterol.

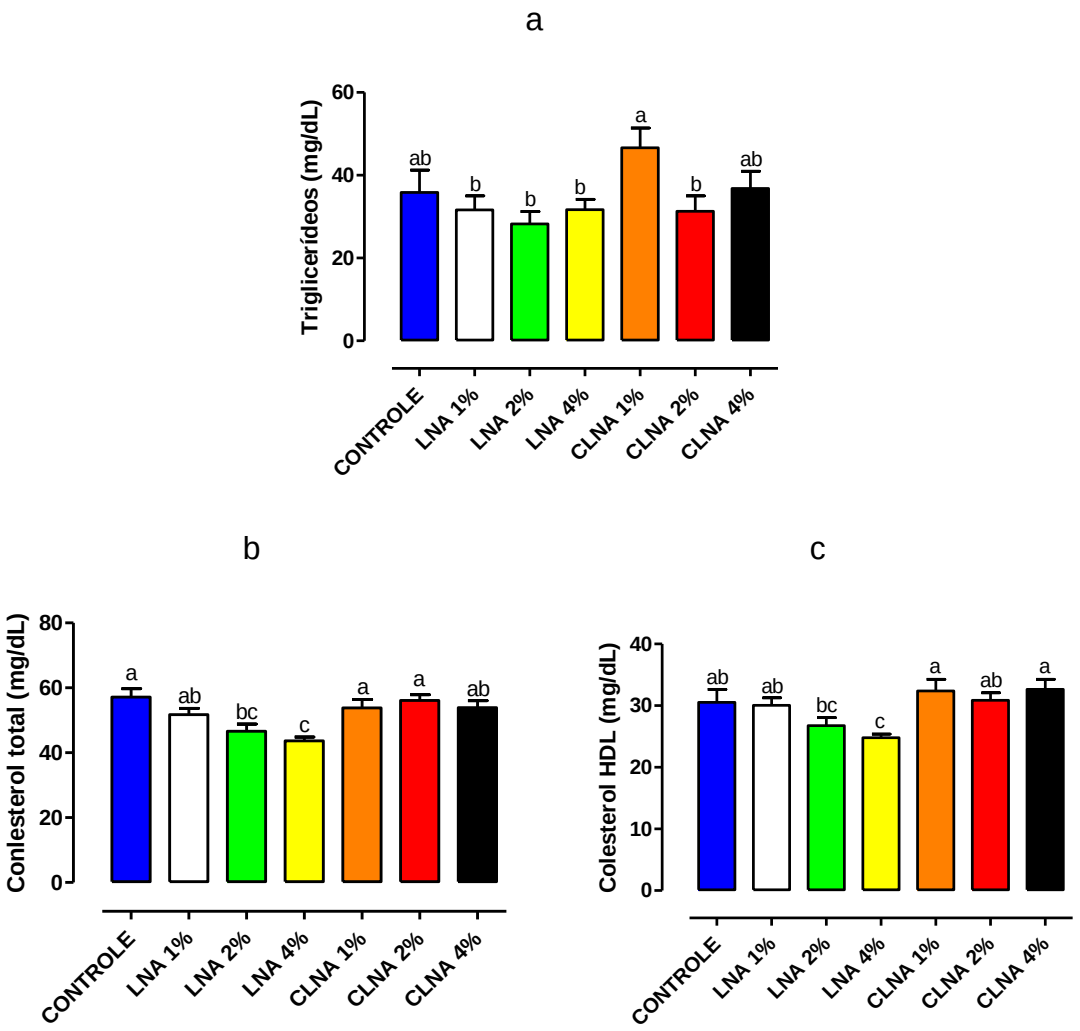


Figura III.5. Parâmetros bioquímicos plasmáticos: (a) triglicerídeos (p=0,04), (b) colesterol total (p<0,01) e (c) HDL-colesterol (p=0,01), dos animais suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias.

Alguns estudos verificaram que a suplementação com CLNAs diminui significativamente o CT no soro (DHAR et al., 2006; KOBA et al., 2002), ApoB-100 (ARAO et al., 2004[b]) e TG hepático (ARAO et al., 2004[ab]). No entanto, os resultados por nós obtidos (Figura III.5) não demonstram efeitos em reduzir tanto os TG como o CT no soro dos animais suplementados com PSO. Estes resultados estão em concordância com outros trabalhos que foram realizados com o objetivo de avaliar estes indicadores do metabolismo lipídico. Yang et al. (2005) observaram no fígado de hamsters que a suplementação de 12,2 g/kg

de PA por 42 dias não afetou os níveis séricos de TG, CT, HDL-C e não HDL-C, mas apresentaram efeitos significativos na redução do CT. Por outro lado, Yamasaki et al. (2006) relataram um aumento significativo de TG e fosfolipídios séricos, mas não no CT em ratos alimentados com 0,12% e 1,2% PSO. Koba et al. (2007) não encontraram efeito significativo do PA nos lipídeos séricos em camundongos, mas os níveis de TG no fígado foram significativamente menores quando comparados ao grupo controle. Esta observação está de acordo com os resultados de Yuan et al. (2009[f]), que também não observaram diferenças significativas nos níveis de TG, CT, HDL-C e LDL-C no plasma de camundongos alimentados com a dieta controle ou alimentados com α-ESA ou PA por seis semanas, mas os níveis de TG no fígado foram significativamente menores em relação ao grupo controle. Já Miranda et al. (2009) não encontraram qualquer diferença nos níveis de CT e TG tanto no soro como no fígado de ratos suplementados por sete semanas com uma dieta hiperlipídica, contendo 0,5% de óleo da semente de jacarandá (rico em CLNA C18:3-8*c*10*t*12*c*).

Existem poucos dados sobre o efeito de CLNAs no perfil lipídico em seres humanos. Mirmiran et al. (2010) concluíram em seu estudo que o consumo de PSO por indivíduos hiperlipidêmicos durante quatro semanas não alterou o CT e o LDL-C, mas reduziu TG e a razão TG : HDL-C. Estudos adicionais com maior número de amostras e maior tempo de duração são necessários para confirmar os efeitos do PSO e seus mecanismos associados.

Na Figura III.6, pode-se observar que não houve diferença significativa para os valores de AST e ALT entre os grupos estudados, indicando que a suplementação com PSO não provocou dano hepático.

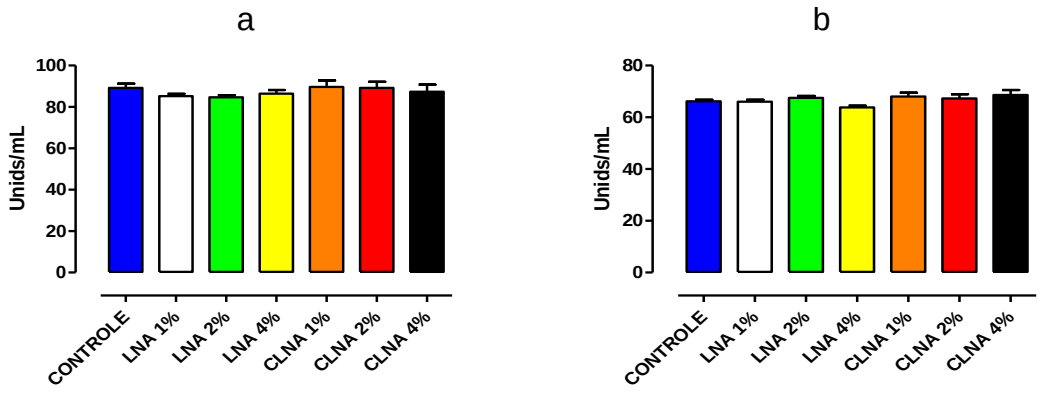


Figura III.6. Parâmetros bioquímicos plasmáticos: (a) alanina aminotransferase e (b) aspartato aminotransferase, dos animais suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias.

4.3 Lipídeos totais e perfil de ácidos graxos nos tecidos

Os lipídeos dos tecidos obtidos dos animais suplementados com OL e PSO foram extraídos a fim de analisar o perfil de ácidos graxos dos mesmos. Com isto, foi possível avaliar o conteúdo de lipídeos totais de cada tecido, conforme observado na Tabela III.3. A suplementação com PSO resultou em aumento no conteúdo lipídico dos tecidos hepático, cerebral e renal, mas não foram observadas alterações significativas nos tecidos musculares (gastrocnêmio e coração) e adiposos.

Tabela III.3. Conteúdo de lipídeos totais em tecidos de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias.

	Lipídeos Totais (%)						
Grupos	**Fígado**	**Cérebro**	**Músculo**	**Coração**	**Rim**	**TAR**	**TAE**
Controle	2,9 ± 0,17[b]	4,6 ± 0,68[d]	1,4 ± 0,10	2,4 ± 0,56	2,3 ± 0,11[c]	74 ± 17,3	78 ± 6,4[abc]
LNA 1%	3,3 ± 0,16[b]	5,1 ± 0,39[cd]	1,5 ± 0,12	2,5 ± 0,57	2,9 ± 0,32[bc]	76 ± 9,8	83 ± 10,8[ab]
LNA 2%	3,5 ± 0,93[b]	5,8 ± 1,11[c]	1,6 ± 0,34	2,6 ± 0,32	3,0 ± 0,23[bc]	75 ± 7,0	71 ± 6,13[bc]
LNA 4%	4,3 ± 0,74[a]	6,1 ± 0,43[abc]	1,4 ± 0,18	2,6 ± 0,79	3,2 ± 0,38[b]	75 ± 10,7	67 ± 10,1[c]
CLNA 1%	4,3 ± 0,01[a]	7,0 ± 0,86[a]	1,5 ±0,27	2,5 ± 0,10	3,3 ± 0,06[b]	71 ± 6,7	91 ± 9,4[a]
CLNA 2%	4,0 ± 0,61[a]	6,5 ± 1,12[ab]	1,3 ± 0,25	2,7 ± 0,27	4,4 ± 0,54[a]	69 ± 15,1	71 ± 12,1[bc]
CLNA 4%	4,4 ± 1,52[a]	6,6 ± 0,16[ab]	1,3 ±0,33	3,1 ± 0,34	4,9 ± 1,11[a]	67 ± 9,0	87 ± 9,5[a]
P-valor	<0,01	0,01	0,59	0,52	<0,01	0,88	0,01

TAR = Tecido adiposo retroperitonial; TAE = Tecido adiposo epididimal. Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=8 para fígado; n=4 para os outros tecidos). Letras diferentes em uma mesma coluna diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

Embora os trabalhos com CLAs relatem vários efeitos benéficos à saúde, também existem investigações sobre a possibilidade de efeitos adversos do consumo de CLAs, particularmente com relação ao acúmulo de lipídeos no fígado que podem levar a esteatose hepática (VYAS; KADEGOWDA; ERDMAN, 2012; ANDREOLI et al., 2009). Entretanto, Santos-Zago et al. (2011) mostraram que os teores de lipídeos no fígado de ratos suplementados com CLAs não diferiram do grupo controle, mas pode ser observado que existiu um aumento de glóbulos de gordura no fígado dos animais suplementados com CLAs, conforme mostrou a histopatologia desse tecido, embora isto não tenha alterado o padrão histológico das organelas celulares.

As Tabelas III.4, III.5, III.6, III.7, III.8, III.9 e III.10 mostram o percentual de ácidos graxos encontrados nos lipídeos dos tecidos hepático, cerebral, muscular, cardíaco, renal e adiposos retroperitonial e epididimal, respectivamente.

Tabela III.4. Perfil de ácidos graxos (AGs) no tecido hepático de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias.

AGs	CONTROLE	LNA 1%	LNA 2%	LNA 4%	CLNA 1%	CLNA 2%	CLNA 4%
C 16:0	17,3 ± 0,6 [ac]	16,7 ± 0,8 [ab]	16,6 ± 0,5 [ab]	15,3 ± 0,7 [b]	17,5 ± 1,2 [a]	17,5 ± 1,5 [a]	16,0 ± 1,1 [bc]
C 18:0	19,1 ± 1,0	19,8 ± 1,3	20,5 ± 0,6	20,4 ± 1,7	19,2 ± 0,8	18,6 ± 1,9	18,9 ± 1,8
C 18:1*c* ω-9	8,2 ± 0,9 [ab]	7,5 ± 0,5 [ab]	7,3 ± 0,4 [ab]	6,8 ± 0,8 [a]	7,2 ± 1,6 [ab]	8,7 ± 1,2 [b]	6,1 ± 0,9 [c]
C 18:2*c*ω-6	21,8 ± 0,8 [ab]	22,2 ± 1,4 [ab]	22,4 ± 0,9 [ab]	24,8 ± 1,9 [a]	21,5 ± 1,6 [ab]	22,5 ± 3,3 [b]	21,2 ± 2,8 [bc]
C 18:3*c*ω-3	0,7 ± 0,1 [a]	1,8 ± 0,3 [b]	2,7 ± 0,5 [c]	4,6 ± 0,7 [d]	0,8 ± 0,1 [a]	1,0 ± 0,3 [a]	0,7 ± 0,2 [a]
CLA 9*c*11*t*					1,4 ± 0,2 [a]	3,2 ± 0,8 [b]	4,6 ± 1,1 [c]
CLA 10*c*12*c*					0,7 ± 0,1 [a]	1,2 ± 0,2 [b]	1,8 ± 0,3 [c]
C 20:4 ω-6	28,1 ± 0,8 [a]	24,8 ± 1,3 [b]	22,8 ± 0,8 [b]	19,1 ± 2,2 [c]	26,2 ± 2,0 [ab]	22,4 ± 2,2 [b]	24,9 ± 2,4 [ab]
C 24:0		1,1 ± 0,2 [a]	1,7 ± 0,2 [b]	2,7 ± 0,4 [c]			
NI		1,4 ± 0,2 [a]	1,6 ± 0,1 [a]	2,3 ± 0,3 [b]	0,8 ± 0,2 [c]	0,7 ± 0,2 [c]	0,7 ± 0,2 [c]
C 22:6 ω-3	4,6 ± 0,6	4,9 ± 0,8	4,5 ± 0,7	4,1 ± 0,5	4,7 ± 0,9	5,0 ± 0,9	5,1 ± 0,8

*Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=8) das porcentagens de ácidos graxos; letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si, $p<0,05$. NI = não identificado.

Tabela III.5. Perfil de ácidos graxos (AGs) no tecido cerebral de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias.

AGs	CONTROLE	LNA 1%	LNA 2%	LNA 4%	CLNA 1%	CLNA 2%	CLNA 4%
C 16:0	23,6 ± 0,6	23,5 ± 0,4	22,3 ± 1,4	21,8 ± 0,6	21,9 ± 0,6	21,9 ± 1,6	22,1 ± 0,5
C 18:0	21,0 ± 0,8	21,5 ± 0,2	21,3 ± 0,4	21,1 ± 0,2	20,9 ± 1,2	21,1 ± 0,7	21,6 ± 0,6
C 18:1*c*ω-9	20,3 ± 1,4	19,5 ± 0,4	21,6 ± 3,2	22,5 ± 1,1	22,9 ± 5,1	21,9 ± 4,1	20,8 ± 1,2
C 18:2*c*ω-6	1,4 ± 0,4 [ab]	1,1 ± 0,1 [a]	1,4 ± 0,3 [ab]	1,4 ± 0,2 [ab]	2,2 ± 0,6 [b]	1,6 ± 0,4 [ab]	1,2 ± 0,2 [a]
C 18:3*c*ω-3	1,5 ± 0,6	1,1 ± 0,1	1,9 ± 0,5	1,9 ± 0,5	1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,3	2,1 ± 0,6
C 20:4 ω-6	11,2 ± 1,2	11,5 ± 0,4	10,9 ± 1,6	10,5 ± 0,8	10,3 ± 1,5	10,4 ± 1,4	11,4 ± 1,4
C 22:4 ω-6	4,0 ± 0,7	4,0 ± 0,5	3,6 ± 0,7	4,2 ± 0,3	4,3 ± 0,2	4,3 ± 0,7	3,8 ± 0,2
NI	1,8 ± 0,2 [ab]	1,2 ± 0,2 [bcd]	1,1 ± 0,3 [cd]	0,7 ± 0,2 [d]	1,8 ± 0,3 [a]	1,7 ± 0,5 [ac]	1,9 ± 0,3 [a]
C 22:6 ω-3	15,4 ± 0,7	16,7 ± 0,2	16,1 ± 0,9	15,8 ± 0,4	14,3 ± 1,6	15,5 ± 1,0	15,1 ± 0,6

[*]Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=4) das porcentagens de ácidos graxos; letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si, $p<0,05$. NI = não identificado.

Tabela III.6. Perfil de ácidos graxos (AGs) no músculo gastrocnêmio de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias.

AGs	CONTROLE	LNA 1%	LNA 2%	LNA 4%	CLNA 1%	CLNA 2%	CLNA 4%
C 16:0	21,0 ± 0,6	20,1 ± 0,7	20,3 ± 0,8	20,6 ± 1,0	23,3 ± 2,2	23,1 ± 2,0	23,0 ± 2,8
C 18:0	14,6 ± 2,4	15,0 ± 0,8	15,1 ± 1,8	17,5 ± 1,7	15,7 ± 1,8	16,0 ± 2,2	16,9 ± 2,6
C 18:1*c* ω-9	11,2 ± 4,6	10,3 ± 0,2	9,7 ± 1,7	8,8 ± 1,5	12,1 ± 5,5	11,1 ± 5,3	10,0 ± 3,1
C 18:2*c*ω-6	26,7 ± 1,4	27,6 ± 1,3	26,8 ± 1,5	25,0 ± 0,9	26,3 ± 3,6	26,1 ± 1,7	25,9 ± 2,4
C 18:3*c*ω-3	1,0 ± 0,3 [a]	2,4 ± 0,2 [b]	3,7 ± 0,7 [bc]	4,4 ± 1,2 [c]	0,9 ± 0,4 [a]	1,0 ± 0,3 [a]	0,9 ± 0,2 [a]
CLA 9*c*11*t*					1,3 ± 0,4 [a]	2,3 ± 0,6 [ab]	3,4 ± 1,1 [b]
CLA 10*c*12*c*					0,7 ± 0,4 [a]	1,1 ± 0,3 [ab]	1,6 ± 0,4 [b]
C 20:4 ω-6	15,2 ± 2,2	11,5 ± 0,3	10,9 ± 1,1	9,7 ± 1,1	10,0 ± 6,8	11,6 ± 3,1	11,2 ± 2,1
C 22:4 ω-6	2,2 ± 0,2 [a]	3,7 ± 0,2 [b]	4,4 ± 0,3 [bc]	5,4 ± 0,4 [c]	2,5 ± 0,4 [a]	2,0 ± 0,4 [a]	1,9 ± 0,2 [a]
C 22:6 ω-3	8,1 ± 1,6 [ab]	9,3 ± 0,4 [a]	9,0 ± 0,5 [a]	8,5 ± 0,5 [ac]	7,1 ± 1,8 [ac]	5,7 ± 2,3 [bc]	5,2 ± 0,6 [b]

[x]Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=4) das porcentagens de ácidos graxos; letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si, $p<0,05$. NI = não identificado.

Tabela III.7. Perfil de ácidos graxos (AGs) no tecido cardíaco de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias.

AGs	CONTROLE	LNA 1%	LNA 2%	LNA 4%	CLNA 1%	CLNA 2%	CLNA 4%
C16:0	12,2 ± 1,1	12,7 ± 1,0	14,4 ± 2,0	11,9 ± 1,7	13,4 ± 2,3	16,6 ± 2,6	15,1 ± 1,3
C18:0	20,5 ± 1,8	22,5 ± 2,4	25,4 ± 2,0	25,0 ± 4,7	20,2 ± 0,8	26,8 ± 5,2	26,3 ± 2,0
C 18:1*c*ω-9	7,6 ± 1,8	8,5 ± 1,1	11,0 ± 2,6	9,4 ± 1,6	9,0 ± 3,0	10,8 ± 3,1	9,0 ± 1,3
C 18:1*c* ω-7	3,3 ± 0,2 [a]	3,0 ± 0,3 [a]	3,1 ± 0,4 [a]	2,8 ± 0,5 [ab]	2,6 ± 0,1 [ab]	2,8 ± 0,3 [ab]	2,2 ± 0,2 [b]
C 18:2*c*ω-6	26,5 ± 1,7 [a]	25,6 ± 1,0 [ab]	25,1 ± 2,2 [ab]	25,2 ± 0,8 [ab]	24,9 ± 0,7 [abc]	23,4 ± 1,2 [bc]	21,9 ± 1,0 [c]
C 18:3*c*ω-3	0,7 ± 0,1 [a]	2,2 ± 0,4 [b]	3,5 ± 0,5 [c]	5,2 ± 1,2 [d]	0,7 ± 0,1 [a]	0,5 ± 0,1 [ab]	0,5 ± 0,1 [a]
CLA 9*c*11*t*					1,1 ± 0,1 [a]	2,0 ± 0,5 [b]	3,6 ± 0,4 [c]
CLA 10*t*12*c*					0,8 ± 0,1 [a]	1,3 ± 0,0 [b]	1,9 ± 0,2 [c]
CLA 10*c*12*c*					0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0
C 20:4 ω-6	18,5 ± 1,9 [a]	14,0 ± 2,0 [ab]	9,8 ± 3,6 [b]	11,4 ± 2,8 [b]	16,9 ± 2,4 [a]	10,4 ± 3,5 [b]	13,0 ± 2,5 [ab]
C 22:4 ω-6	1,4 ± 0,1 [a]	0,8 ± 0,1 [b]	0,5 ± 0,1 [c]	0,4 ± 0,0 [c]	1,1 ± 0,0 [d]	0,7 ± 0,1 [be]	0,8 ± 0,2 [b]
NI	0,8 ± 0,1 [a]	0,4 ± 0,1 [bc]	0,2 ± 0,1 [b]	0,2 ± 0,1 [b]	0,7 ± 0,1 [ac]	0,4 ± 0,2 [b]	0,5 ± 0,2 [ac]
NI	1,4 ± 0,2 [ac]	2,6 ± 0,5 [ab]	2,2 ± 1,0 [abc]	3,3 ± 1,3 [b]	1,4 ± 0,1 [ac]	0,7 ± 0,3 [c]	0,8 ± 0,2 [c]
C 22:6 ω-3	7,1 ± 0,8	7,6 ± 2,0	4,9 ± 3,7	5,2 ± 2,6	7,0 ± 1,8	3,1 ± 2,4	4,2 ± 1,3

[*]Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=4) das porcentagens de ácidos graxos; letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si, $p<0,05$. NI = não identificado.

Tabela III.8. Perfil de ácidos graxos (AGs) no tecido renal de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias.

AGs	CONTROLE	LNA 1%	LNA 2%	LNA 4%	CLNA 1%	CLNA 2%	CLNA 4%
C16:0	18,3 ± 1,2	18,4 ± 0,5	18,4 ± 0,3	17,3 ± 0,3	19,1 ± 0,7	19,7 ± 2,3	18,2 ± 0,4
C16:1*c*ω-7	0,8 ± 0,3	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,1	0,7 ± 0,2	1,0 ± 0,4	2,0 ± 1,8	1,1 ± 0,2
C18:0	17,4 ± 1,7	17,4 ± 0,8	15,1 ± 1,3	16,5 ± 1,9	18,0 ± 0,9	15,0 ± 1,6	14,8 ± 1,9
C 18:1*c*ω-9	10,1 ± 2,1	9,6 ± 0,8	12,8 ± 1,4	11,7 ± 2,3	8,8 ± 1,5	12,3 ± 4,4	10,3 ± 1,1
C 18:1*c*ω-7	2,1 ± 0,3 [a]	2,1 ± 0,0 [a]	1,9 ± 0,0 [ab]	1,2 ± 0,8 [b]	1,9 ± 0,2 [ab]	1,8 ± 0,3 [ab]	1,4 ± 0,1 [ab]
C 18:2*c*ω-6	17,8 ± 3,0	19,1 ± 1,2	22,4 ± 1,1	22,3 ± 1,9	15,3 ± 1,3	17,8 ± 3,4	18,6 ± 2,2
C 18:3*c*ω-3	2,0 ± 3,1 [ac]	1,6 ± 0,2 [ac]	4,4 ± 1,1 [ac]	5,6 ± 1,8 [b]	0,4 ± 0,2 [c]	0,6 ± 0,1 [c]	0,6 ± 0,2 [c]
CLA 9*c*11*t*					0,8 ± 0,2 [a]	2,2 ± 0,7 [a]	4,7 ± 1,5 [b]
CLA 10*t*12*c*					0,3 ± 0,1 [a]	1,0 ± 0,2 [a]	2,1 ± 0,9 [b]
CLA 10*c*12*c*					0,4 ± 0,0 [a]	0,3 ± 0,0 [b]	0,3 ± 0,0 [b]
C 20:3 ω-6	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,4	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,2
C 20:4 ω-6	27,6 ± 5,9 [ab]	26,9 ± 1,7 [ab]	20,3 ± 2,3 [a]	20,7 ± 3,9 [a]	30,0 ± 2,2 [b]	23,5 ± 3,8 [ab]	22,9 ± 4,1 [ab]
C 24:0	0,2 ± 0,0 [a]	0,6 ± 0,1 [b]	0,7 ± 0,0 [b]	1,2 ± 0,1 [c]			
PA					0,2 ± 0,1 [a]	0,7 ± 0,2 [ab]	1,8 ± 1,0 [b]
α-ESA						0,1 0,0	0,1 0,1
C 22:4 ω-6	0,9 ± 0,1 [a]	0,5 ± 0,0 [be]	0,4 ± 0,0 [be]	0,3 ± 0,1 [c]	0,7 ± 0,1 [d]	0,6 ± 0,1 [de]	0,5 ± 0,1 [e]
NI	0,2 ± 0,1 [a]				0,2 ± 0,0 [a]	0,1 ± 0,0 [ab]	0,1 ± 0,0 [b]
NI	0,5 ± 0,2 [ac]	0,7 ± 0,1 [ab]	0,6 ± 0,0 [ad]	0,9 ± 0,2 [b]	0,4 ± 0,0 [cd]	0,3 ± 0,0 [c]	0,3 ± 0,1 [c]
C 22:6 ω-3	1,3 ± 0,3	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,3

*Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=4) das porcentagens de ácidos graxos; letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si, $p<0,05$. NI = não identificado; PA = ácido punícico; α-ESA = ácido α-eleosteárico.

Tabela III.9. Perfil de ácidos graxos (AGs) no tecido adiposo retroperitonial de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias.

AGs	CONTROLE	LNA 1%	LNA 2%	LNA 4%	CLNA 1%	CLNA 2%	CLNA 4%
C 13:0	3,00 ± 0,62	2,74 ± 0,44	2,95 ± 0,43	2,79 ± 0,71	2,67 ± 0,35	2,75 ± 0,47	2,62 ± 0,40
C 14:0	1,14 ± 0,04	0,93 ± 0,06	0,98 ± 0,11	0,95 ± 0,04	1,08 ± 0,09	1,01 ± 0,08	0,94 ± 0,09
C 15:0	0,22 ± 0,01	0,24 ± 0,04	0,28 ± 0,06	0,29 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,23 ± 0,04	0,21 ± 0,03
C 16:0	21,85 ± 0,37	18,82 ± 0,87	19,33 ± 1,05	17,81 ± 0,50	20,33 ± 1,07	19,63 ± 2,15	18,15 ± 1,51
NI	0,20 ± 0,04	0,23 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,18 ± 0,04	0,18 ± 0,01	0,16 ± 0,02
C 16:1*c*ω-7	3,61 ± 0,26	2,79 ± 0,27	3,18 ± 0,48	2,91 ± 0,34	3,12 ± 0,45	3,08 ± 0,75	2,68 ± 0,61
C 17:0	0,22 ± 0,01	0,23 ± 0,03	0,19 ± 0,03	0,20 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,22 ± 0,04	0,22 ± 0,02
C 17:1	0,13 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,14 ± 0,04	0,14 ± 0,07	0,13 ± 0,06
C 18:0	2,97 ± 0,10	2,93 ± 0,14	2,97 ± 0,18	2,76 ± 0,08	2,96 ± 0,82	2,80 ± 0,63	2,50 ± 0,31
C 18:1*t*					0,10 ± 0,02 [b]	0,15 ± 0,06 [ab]	0,21 ± 0,06 [a]
C 18:1*c* ω-9	26,32 ± 0,60	24,42 ± 0,71	24,54 ± 0,55	23,68 ± 0,41	24,70 ± 3,06	22,68 ± 2,54	20,59 ± 1,68
NI					0,19 ± 0,03 [b]	0,23 ± 0,04 [b]	0,34 ± 0,05 [a]
C 18:2*t*					0,26 ± 0,05 [c]	0,44 ± 0,06 [b]	0,62 ± 0,06 [a]
C 18:2*c*ω-6	35,89 ± 0,44 [ab]	36,93 ± 2,70 [a]	31,44 ± 1,59 [abc]	30,46 ± 1,10 [bc]	33,15 ± 3,93 [abc]	30,59 ± 3,93 [bc]	28,64 ± 2,49 [c]
C 18:3*c*ω-6	0,12 ± 0,01 [c]	0,12 ± 0,01 [c]	0,11 ± 0,01 [c]	0,14 ± 0,01 [bc]	0,14 ± 0,02 [bc]	0,16 ± 0,03 [ab]	0,18 ± 0,01 [a]
C 18:3*c*ω-3	2,56 ± 0,09 [d]	7,71 ± 0,74 [c]	11,91 ± 0,78 [b]	16,13 ± 1,32 [a]	2,28 ± 0,25 [d]	1,90 ± 0,17 [d]	1,54 ± 0,09 [d]

AGs	CONTROLE	LNA 1%	LNA 2%	LNA 4%	CLNA 1%	CLNA 2%	CLNA 4%
CLA 9*c*11*t*					3,18 ± 0,60 [c]	6,07 ± 0,89 [b]	9,58 ± 0,80 [a]
CLA 10*t*12*c*					0,03 ± 0,00 [c]	0,07 ± 0,00 [b]	0,11 ± 0,01 [a]
CLA 10*c*12*c*					1,51 ± 0,22 [c]	2,91 ± 0,37 [b]	4,43 ± 0,49 [a]
C 20:2 ω-6	0,29 ± 0,01 [a]	0,22 ± 0,03 [b]	0,19 ± 0,02 [bc]	0,16 ± 0,01 [c]	0,20 ± 0,03 [bc]	0,21 ± 0,03 [bc]	0,17 ± 0,01 [bc]
C 20:3 ω-6	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02
C 20:4 ω-6	0,84 ± 0,08 [a]	0,58 ± 0,06 [bc]	0,50 ± 0,07 [bc]	0,42 ± 0,03 [bc]	0,61 ± 0,13 [b]	0,57 ± 0,16 [bc]	0,39 ± 0,05 [c]
C 22:2					0,10 ± 0,01 [b]	0,15 ± 0,03 [a]	0,15 ± 0,01 [a]
C 24:0	0,08 ± 0,01 [c]	0,23 ± 0,02 [b]	0,27 ± 0,07 [ab]	0,34 ± 0,04 [a]			
PA					2,13 ± 0,16 [c]	3,37 ± 0,43 [b]	4,99 ± 0,74 [a]
α-ESA					0,19 ± 0,03 [b]	0,25 ± 0,03 [ab]	0,28 ± 0,05 [a]
NI	0,17 ± 0,02 [b]	0,34 ± 0,03 [a]	0,41 ± 0,13 [a]	0,34 ± 0,02 [a]			
C 22:6 ω-3	0,26 ± 0,03 [ab]	0,33 ± 0,05 [a]	0,33 ± 0,10 [a]	0,24 ± 0,02 [ab]	0,16 ± 0,04 [bc]	0,12 ± 0,04 [c]	0,06 ± 0,00 [c]

*Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=4) das porcentagens de ácidos graxos; letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si, $p<0,05$. NI = não identificado; PA = ácido punícico; α-ESA = ácido α-eleosteárico.

Tabela III.10. Perfil de ácidos graxos (AGs) no tecido adiposo epididimal de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias.

AGs	CONTROLE	LNA 1%	LNA 2%	LNA 4%	CLNA 1%	CLNA 2%	CLNA 4%
C 13:0	2,72 ± 0,31	3,12 ± 0,44	2,76 ± 0,28	2,72 ± 0,40	3,38 ± 0,39	2,80 ± 0,26	3,24 ± 0,39
C 14:0	1,08 ± 0,04	0,92 ± 0,05	0,93 ± 0,10	0,85 ± 0,07	1,00 ± 0,07	0,99 ± 0,06	0,95 ± 0,11
C 15:0	0,27 ± 0,02 [a]	0,27 ± 0,03 [a]	0,21 ± 0,02 [b]	0,20 ± 0,00 [b]	0,25 ± 0,04 [ab]	0,23 ± 0,02 [ab]	0,23 ± 0,03 [ab]
C 16:0	20,57 ± 0,13	18,87 ± 0,47	17,85 ± 0,92	16,01 ± 0,27	19,36 ± 1,85	19,12 ± 2,50	18,01 ± 2,17
NI	0,27 ± 0,02 [a]	0,26 ± 0,02 [a]	0,25 ± 0,05 [a]	0,21 ± 0,02 [ab]	0,15 ± 0,06 [b]	0,13 ± 0,05 [b]	0,15 ± 0,02 [b]
C 16:1*c*ω-7	3,63 ± 0,23	3,17 ± 0,23	3,34 ± 0,45	3,36 ± 0,53	3,74 ± 0,73	3,60 ± 0,85	3,44 ± 0,76
C 17:0	0,24 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,23 ± 0,03	0,22 ± 0,02	0,21 ± 0,02
C 18:0	2,87 ± 0,12	2,84 ± 0,07	2,78 ± 0,13	2,57 ± 0,09	2,61 ± 0,42	2,59 ± 0,39	2,38 ± 0,32
C 18:1*t*					0,34 ± 0,51	0,14 ± 0,02	0,17 ± 0,04
C 18:1*c* ω-9	26,02 ± 0,30 [a]	24,74 ± 0,35 [ab]	24,24 ± 0,54 [ab]	23,26 ± 0,33 [ab]	23,86 ± 1,85 [ab]	22,82 ± 1,98 [bc]	20,28 ± 1,78 [c]
NI					0,19 ± 0,03 [a]	0,27 ± 0,04 [ab]	0,33 ± 0,05 [b]
C 18:2*t*					0,31 ± 0,05 [a]	0,44 ± 0,04 [a]	0,72 ± 0,11 [b]
C 18:2*c*ω-6	37,05 ± 0,27 [a]	35,17 ± 0,56 [ab]	32,83 ± 1,38 [ab]	31,09 ± 0,63 [bc]	32,99 ± 3,60 [a]	31,13 ± 4,21 [bc]	27,89 ± 2,41 [c]
C 18:3*c*ω-6	0,13 ± 0,02 [ab]	0,13 ± 0,01 [ab]	0,09 ± 0,04 [ad]	0,05 ± 0,01 [cd]	0,17 ± 0,03 [b]	0,19 ± 0,04 [b]	0,17 ± 0,04 [b]
C 18:3*c*ω-3	2,75 ± 0,09 [a]	8,02 ± 0,25 [b]	12,11 ± 0,29 [c]	17,17 ± 1,57 [d]	2,54 ± 0,25 [a]	2,13 ± 0,30 [a]	1,89 ± 0,24 [a]

AGs	CONTROLE	LNA 1%	LNA 2%	LNA 4%	CLNA 1%	CLNA 2%	CLNA 4%
CLA 9*c*11*t*					3,38 ± 0,66 [a]	5,71 ± 0,78 [b]	9,40 ± 1,10 [c]
CLA 10*t*12*c*					0,04 ± 0,01 [a]	0,07 ± 0,01 [b]	0,11 ± 0,02 [c]
CLA 10*c*12*c*					1,52 ± 0,21 [a]	2,56 ± 0,30 [b]	4,11 ± 0,52 [c]
C 20:2 ω-6	0,24 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,24 ± 0,04	0,23 ± 0,04	0,20 ± 0,01
C 20:3 ω-6	0,14 ± 0,02 [a]	0,13 ± 0,02 [ab]	0,13 ± 0,02 [ab]	0,12 ± 0,01 [ab]	0,14 ± 0,01 [a]	0,11 ± 0,02 [ab]	0,10 ± 0,01 [b]
C 20:4 ω-6	1,14 ± 0,21 [a]	0,71 ± 0,16 [ab]	0,71 ± 0,08 [ab]	0,61 ± 0,13 [b]	0,84 ± 0,28 [ab]	0,75 ± 0,25 [ab]	0,49 ± 0,12 [b]
C 22:2					0,11 ± 0,03 [a]	0,14 ± 0,02 [ab]	0,16 ± 0,01 [b]
C 24:0	0,10 ± 0,02 [a]	0,26 ± 0,03 [b]	0,34 ± 0,09 [b]	0,48 ± 0,09 [c]			
PA					2,13 ± 0,25 [a]	3,04 ± 0,24 [a]	4,83 ± 0,87 [b]
α-ESA					0,18 ± 0,04 [a]	0,23 ± 0,03 [ab]	0,30 ± 0,09 [b]
C 22:4 ω-6	0,19 ± 0,03 [a]	0,11 ± 0,02 [b]	0,08 ± 0,01 [bc]	0,05 ± 0,01 [c]	0,12 ± 0,03 [b]	0,09 ± 0,03 [bc]	0,05 ± 0,02 [c]
NI	0,15 ± 0,03 [a]	0,37 ± 0,06 [b]	0,49 ± 0,10 [b]	0,49 ± 0,09 [b]	0,13 ± 0,03 [a]	0,10 ± 0,03 [a]	0,06 ± 0,03 [a]
C 22:6 ω-3	0,29 ± 0,08 [ac]	0,42 ± 0,10 [ab]	0,48 ± 0,06 [b]	0,37 ± 0,09 [ab]	0,21 ± 0,06 [c]	0,18 ± 0,07 [c]	0,11 ± 0,03 [d]

*Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=4) das porcentagens de ácidos graxos; letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si, $p<0,05$. NI = não identificado; PA = ácido punícico; α-ESA = ácido α-eleosteárico.

A análise de composição de ácidos graxos no tecido hepático mostrou que apenas os grupos que receberam óleo de linhaça apresentaram o ácido graxo C24:0 e um aumento na porcentagem do C18:3 (ω-3), de forma dose dependente. Foram observados apenas traços de ácido punícico nos fígados dos animais suplementados com PSO/CLNA; mas, interessantemente, os CLAs (9*c*11*t* e 10*c*12*c*) estiveram presentes em uma forma dependente da dose oferecida. Este resultado está de acordo com a literatura, mostrando que os CLNAs são metabolizados e incorporados no fígado na forma de CLAs, sendo detectado principalmente o isômero C18:2-9*c*11*t* (YANG et al., 2009; YUAN et al., 2009[ae]; TSUZUKI et al., 2006). Apesar de alguns estudos mostrarem que a suplementação com ácido punícico aumenta a proporção de C22:6 (ω-3) no fígado de animais (KOBA et al., 2007; YUAN et al., 2009[a]), este achado não foi observado no presente estudo (Tabela III.4).

Estudos que avaliam a incorporação de CLAs e CLNAs no tecido cerebral são escassos. A tabela III.5 mostra que no cérebro dos animais não foram observadas diferenças no perfil de ácidos graxos entre os grupos, nem a presença de CLAs ou CLNAs nos grupos suplementados com PSO/CLNA. De acordo com Fa et al. (2005), a incorporação de CLAs no cérebro foi detectada apenas em poucos casos e em concentrações muito baixas, os possíveis motivos são: a oferta relativamente baixa de isômeros de CLAs, sendo portanto o aporte insuficiente para serem incorporados; a incorporação preferencial de outros ácidos graxos pelo tecido cerebral; e a contra seleção de ácidos graxos *trans* com duplas ligações, como os CLAs. Um aspecto que se deve destacar também é que o tecido cerebral apresenta a barreira hemato-encefálica, que é seletiva, conforme destacado por Valenzuela (2008), quando discute a menor incorporação de ácidos graxos saturados e *trans* neste tecido.

De uma forma geral, os resultados para o perfil de ácidos graxos nos tecidos muscular (Tabela III.6), cardíaco (Tabela III.7), renal (Tabela III.8) e adiposos retroperitonial (Tabela III.9) e epididimal (Tabela III.10) desmonstraram que as porcentagens do LNA foram mais elevadas nos animais que receberam o OL, de maneira dose dependente. Entretanto, foram apresentados apenas traços de PA nos tecidos muscular e cardíaco dos animais suplementados com PSO/CLNA. Mas, foi possível detectar este ácido

graxo nos tecidos renal e adiposos em porcentagens variando de 0,2-1,8% e 2,1-5,0%; respectivamente. Interessantemente, os CLAs estiveram presentes em todos os tecidos, de uma forma dependente da dose oferecida, sendo o isômero 9*c*11*t*-CLA a forma predominante; encontrado, até mesmo, em maior porcentagem que o PA nos tecidos renal (0,8% a 4,7%) e adiposos (3,2% a 9,6%). No músculo gastrocnêmio, também foi observado aumento no C22:4 ω-6 nos grupos que receberam OL. Porém, este ácido graxo apresentou-se reduzido em todos os grupos suplementados com OL e PSO, quando comparados ao controle, nos tecidos cardíaco, renal e adiposos. No tecido adiposo epididimal, foi possível observar ainda uma redução na proporção dos ácidos graxos C18:1c, C18:2c e C22:6 ω-3 nos grupos suplementados com CLNA.

Os resultados aqui apresentados estão de acordo com alguns estudos que demonstram que os CLNAs são metabolizados a CLAs e que o isômero C18:2-9*c*11*t* também foi detectado nos tecidos (fígado, rim, coração, tecido adiposo, glândula mamária e intestino) de grupos suplementados com PA (NEMER, 2009; YANG et al., 2009; YUAN et al., 2009[ae]; TSUZUKI et al., 2006) e, portanto, muitas das funções desses isômeros são devido aos CLAs. Esses autores também avaliaram a possibilidade de que CLNAs podem ser convertidos em CLA por uma reação de Δ13-saturação realizada por uma enzima dependente de NADPH que ou é uma enzima que reconhece o ácido trienóico conjugado ou a enzima ativa na via redutora do leucotrieno B4. Yuan et al. (2009[f]) mostraram que o PA foi rapidamente convertido em 9*c*,11*t*-CLA no plasma e em diferentes tecidos de ratos. Eles observaram que nem o CLA e nem o PA foram detectados imediatamente após o tratamento (tempo zero), mas ambos foram detectados nos tecidos e plasma de ratos nas 4, 8, 12 e 24 horas após o tratamento (cada rato foi alimentado com cerca de 645 mg de PA).

As quantidades de PA e de CLA no fígado e no plasma dos animais foram maiores do que no coração, rim e tecido adiposo. Em nosso trabalho, pode ser observada nas Tabelas III.8, III.9 e III.10 a presença de PA nos tecidos renal e adiposos, enquanto que o CLA esteve presente em todos os tecidos, sendo o tecido adiposo epididimal o que apresentou maior

porcentagem seguido do fígado, rim, coração e músculo. Estes achados sugerem que a incorporação dos isômeros dos CLAs e CLNAs é dependente / específica do tecido. De acordo com Reena e Lokesh (2011), a composição e organização dos lipídeos nas membranas biológicas são fatores importantes que determinam a sua fluidez. Neste sentido, mais estudos que avaliem os mecanismos de ação desses ácidos graxos específicos nos tecidos dos animais são necessários.

4.4 Morfometria dos tecidos hepático, muscular e adiposo

De acordo com o item anterior, pode-se observar que a suplementação com PSO aumenta o conteúdo total de lipídeos no tecido hepático de ratos e que o PA presente no PSO oferecido aos animais é metabolizado e incorporado na forma de CLAs, de maneira dose resposta. Apesar disto, não foram observadas quaisquer alterações da morfologia do tecido hepático, uma vez que os cortes histológicos mostraram hepatócitos em disposição radial, com núcleos e citoplasma preservados. Na Figura III.7 estão apresentadas as lâminas do tecido hepático dos grupos controle, LNA 2% e CLNA 2%; uma vez que não existiu diferenças entre as porcentagens oferecidas, as fotomicrografias do grupo 2% é representativa de todos os grupos suplementados com o mesmo óleo. Este achado está de acordo com Santos-Zago et al. (2011), que apesar de observarem um aumento de glóbulos de gordura no fígado de ratos suplementados com CLAs durante 21 dias, conforme mostrou a histopatologia desse tecido, isto não alterou o padrão histológico das organelas celulares.

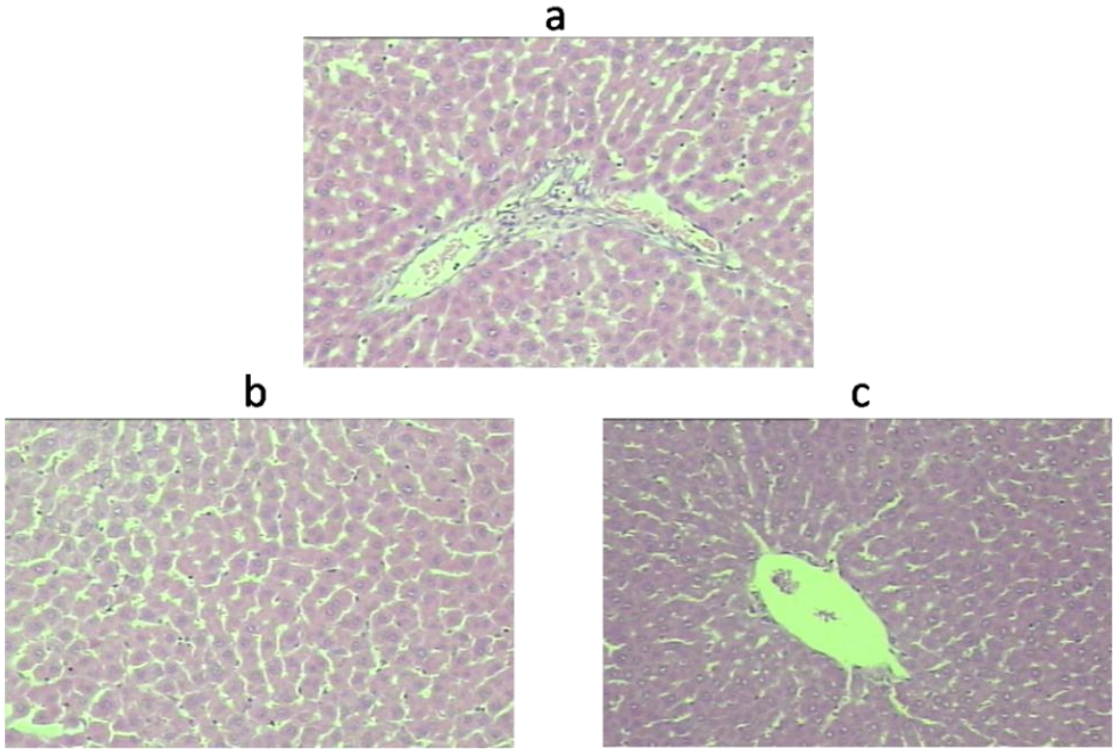


Figura III.7. Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado: (a) grupo controle, (b) grupo suplementado com óleo de linhaça 2% e (c) grupo suplementado com óleo da semente de romã 2%. Seções transversais coradas com HE aumentadas 10x.

Com relação a análise histológica do tecido muscular (gastrocnêmio) dos animais, a Figura III.8 mostra que não existiu diferenças significativas para a área das fibras musculares, bem como para o diâmetro das fibras, quando comparados com o grupo controle.

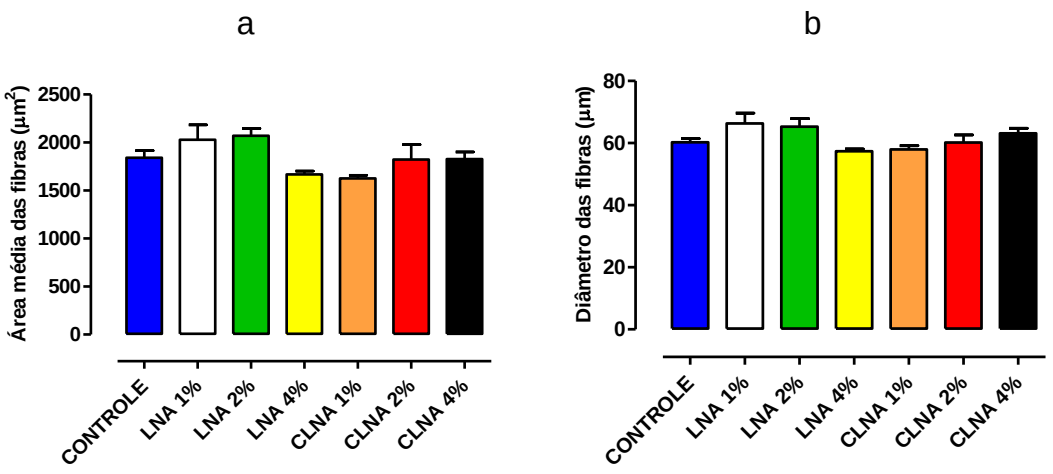


Figura III.8. Valores referentes à (a) área e (b) diâmetro das fibras musculares, no músculo gastrocnêmio de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias.

Esperava-se que o CLNA provocasse mudanças na área e diâmetro do tecido muscular devido a incorporação dos CLAs nesses tecidos. Porém os resultados para esses parâmetros não foram significativos. Na Figura III.9 observam-se as fotomicrografias de cortes histológicos de tecido muscular dos grupos controle, LNA 2% e CLNA 2%; estes últimos foram eleitos como representativos de todos os grupos que receberam OL e PSO, respectivamente. Considerando o total de observações nos músculos dos animais tratados com água/controle, OL/LNA e PSO/CLNA, tanto a área como o diâmetro obtidos foram semelhantes entre os grupos estudados.

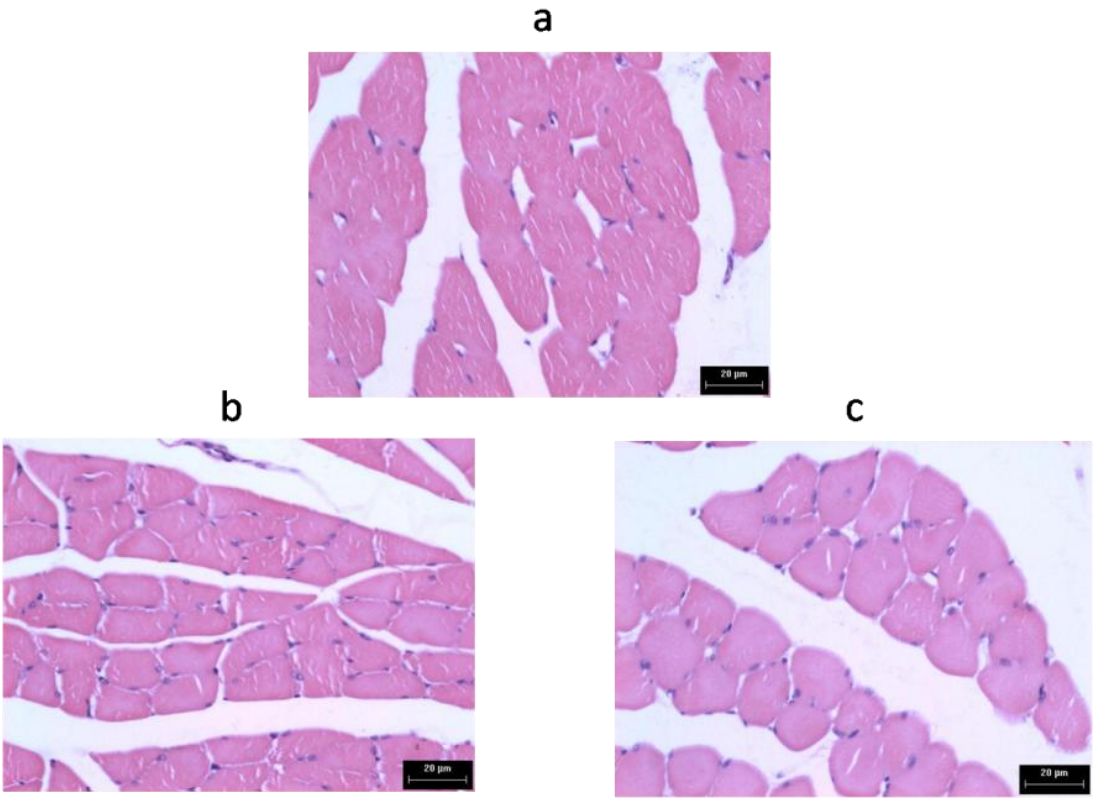


Figura III.9. Fotomicrografias de cortes histológicos de músculo (gastrocnêmio): (a) grupo controle, (b) grupo suplementado com óleo de linhaça 2% e (c) grupo suplementado com óleo da semente de romã 2%. Seções transversais coradas com HE aumentadas 20x (escala de 20 µm).

A Figura III.10 apresenta o diâmetro e a celularidade dos adipócitos do tecido epididimal. A celularidade foi calculada a partir da massa total do tecido adiposo epididimal dividido pela massa do adipócito, obtida a partir do diâmetro. Pode-se observar que houve um aumento significativo no diâmetro celular dos grupos suplementados com 4% de OL e em todos os grupos suplementados com PSO, quando comparados com o grupo controle. Assim como existiu uma redução na celularidade nesses grupos, indicando que a suplementação com PSO não aumenta a quantidade de células adiposas, mas sim o tamanho dos adipócitos. As fotomicrografias do tecido adiposo epididimal representativas dos grupos controle, LNA e CLNA são mostradas na Figura III.11.

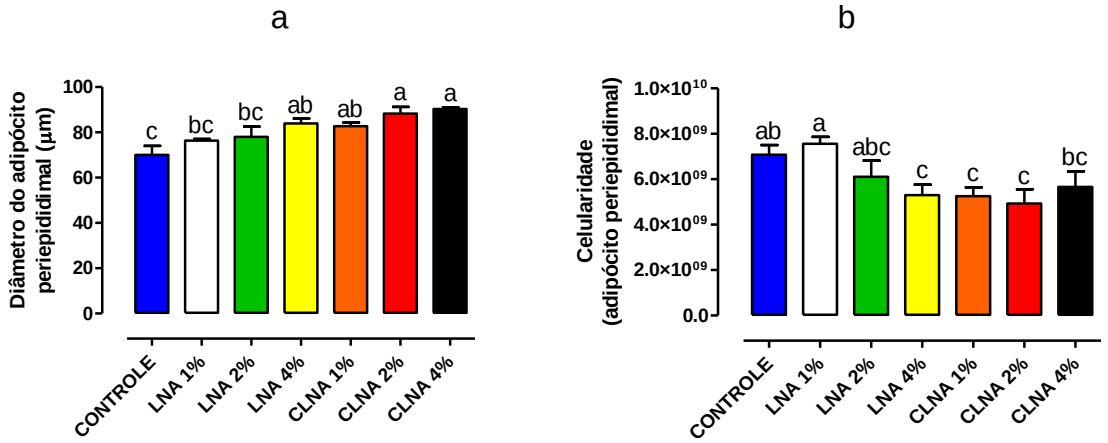


Figura III.10. Valores referentes ao (a) diâmetro (p<0,01) e (b) celularidade (p=0,01) dos adipócitos epididimais d**e** ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias.

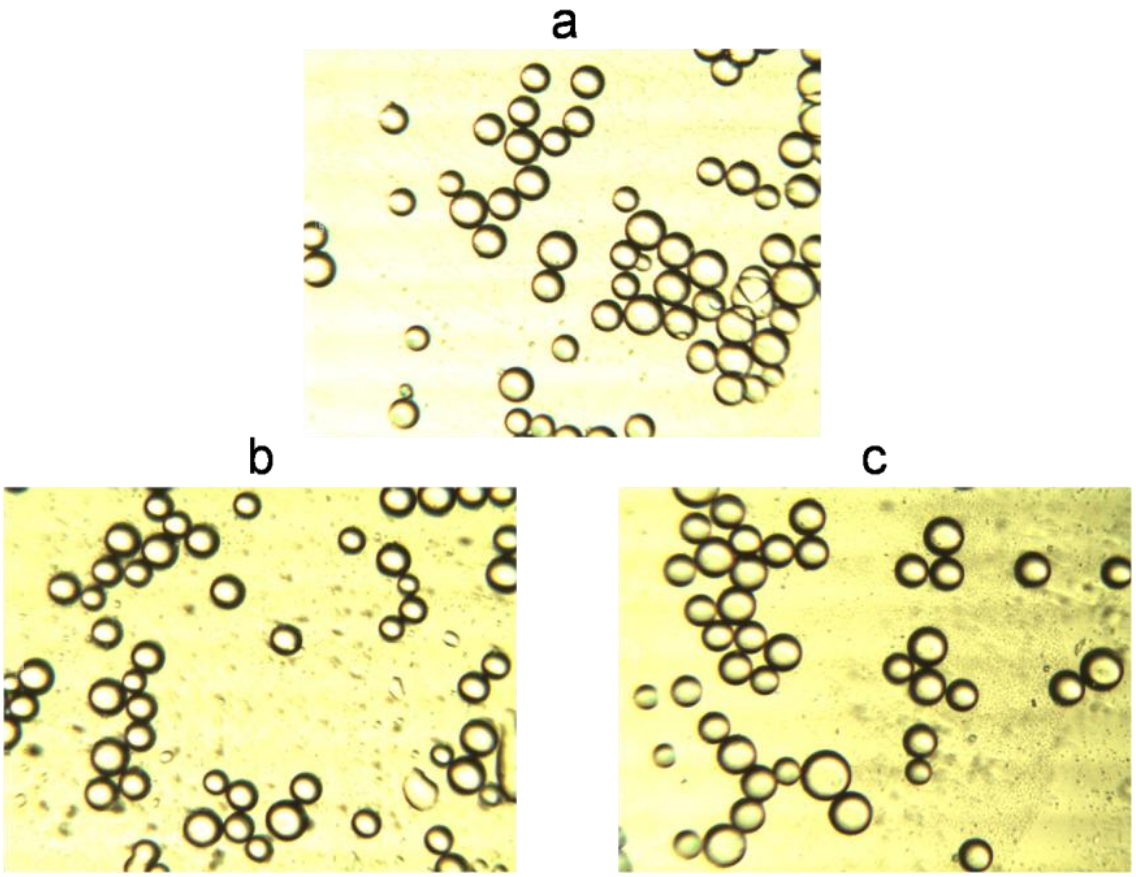


Figura III.11. Fotomicrografias dos adipócitos epididimais: (a) grupo controle, (b) grupo suplementado com óleo de linhaça 2% e (c) grupo suplementado com óleo da semente de romã 2%.

Lopes et al. (2008) investigaram o efeito dos CLAs no número e no tamanho dos adipócitos do tecido adiposo inguinal e retroperitoneal em ratos Wistar. A dieta foi modificada acrescentando 5,1% de óleo de palma e os grupos experimentais foram suplementados por oito semanas com isômeros de CLAs da seguinte forma: 0,6% do 9*c*11*t*; 0,6% do 10*t*12*c;* 1,3% do mix 9*c*11*t* e 10*t*12*c*. A suplementação com o isômero 9*c*11*t*-CLA aumentou o tamanho do adipócito, com uma consequente redução no número de adipócitos por unidade de área. Neste sentido, os resultados encontrados neste trabalho podem ser devido a metabolização do PA a 9*c*11*t*-CLA no tecido adiposo. Segundo Queiroz et al. (2009), adipócitos muito grandes, além do esgotamento da capacidade de estocagem de gordura, tornam-se mais lipolíticos. Isso pode desencadear aumento na concentração de ácidos graxos livres no plasma e danificar a função de órgãos não adiposos, num processo identificado como lipotoxicidade.

A habilidade do CLA em alterar a composição corporal, aumentando a massa magra e reduzindo a gordura corporal em diferentes espécies, tais como: camundongos, hamsters, ratos, porcos e humanos tem sido amplamente estudada (KENNEDY et al., 2010; LOPES, 2010; RAHMAN et al., 2009). Uma vez que a suplementação com PSO levou a incorporação de CLAs nos tecidos muscular e adiposo, era esperado que houvesse mudanças na área e diâmetro do tecido muscular, bem como no tamanho das células adiposas. Porém os resultados para esses parâmetros não mostraram diferenças significativas. Ao contrário, a suplementação com CLNA resultou em aumento no diâmetro do adipócito epididimal, apesar de não interferir na celularidade. Este resultado nos leva a acreditar que os efeitos não são atribuídos ao isômero 9*c*11*t*-CLA, principal forma encontrada nos tecidos dos animais suplementados com PSO. Estudos mostram que cada isômero de CLA possui distinto modo de ação (OBSEN et al., 2012; GOEDECKE et al., 2009; BISSONAUTH et al., 2006). De acordo com Rahman et al. (2009), a suplementação de camundongos fêmeas com 0,5% de isômeros isolados de CLAs (9*c*11*t* ou 10*t*12*c*) e também com 0,5% de um mix desses isômeros por seis meses, mostrou aumento da massa muscular significativamente maior nos grupos que receberam o 10*t*12*c*-CLA e grupo CLA-mix, quando comparados aos suplementados com 0,5% de 9*c*11*t* e

com a dieta controle (óleo de milho). Enquanto que Obsen et al. (2012) concluíram em seu estudo utilizando células de adipócitos humanos que apenas o isômero 10*t*12*c*-CLA diminui a síntese de lipídeo *de novo*, sugerindo um mecanismo antiobesidade para este isômero. Outros trabalhos também têm relatado que o principal isômero responsável pelo efeito de alteração no metabolismo lipídico e composição corporal é o 10*t*12*c*-CLA (FEITOZA et al., 2009; BISSONAUTH et al., 2006). Apesar de ainda não existir um consenso na literatura quanto aos efeitos dos CLAs na modulação da composição corporal, este resultado parece ser devido principalmente ao isômero 10*t*12*c*-CLA. Esta seria uma possível explicação para os resultados aqui encontrados, uma vez que o PA presente no PSO foi metabolizado nos tecidos estudados principalmente na forma de 9*c*11*t*-CLA.

4.5 Peroxidação lipídica

Os valores de TBARS no soro e nos tecidos (fígado, músculo, coração e rim) dos animais suplementados com os óleos ricos em LNA e CLNA/PA não diferiram estatisticamente entre os grupos. Enquanto que no cérebro, tanto o OL como o PSO foram capazes de reduzir significativamente os teores de TBARS em todas as concentrações oferecidas quando comparados ao grupo controle (Figura III.12).

Estudos mostraram que os CLNAs suprimem o crescimento de células tumorais através de um mecanismo que envolve a peroxidação lipídica (GROSSMANN et al., 2009; TSUZUKI et al., 2004[b]; IGARASHI; MIYAZAWA, 2000). Destacando também que alguns pesquisadores relatam que os ácidos graxos conjugados apresentam atividade antioxidante e esta seria a possível explicação para seus efeitos benéficos para a saúde (ALI et al., 2012; TSUZUKI et al., 2004[a]; YU, 2001). Segundo Yang et al. (2009), embora os mecanismos das atividades biológicas referentes aos CLNAs sejam relacionados à oxidação, muitos resultados controversos são relatados.

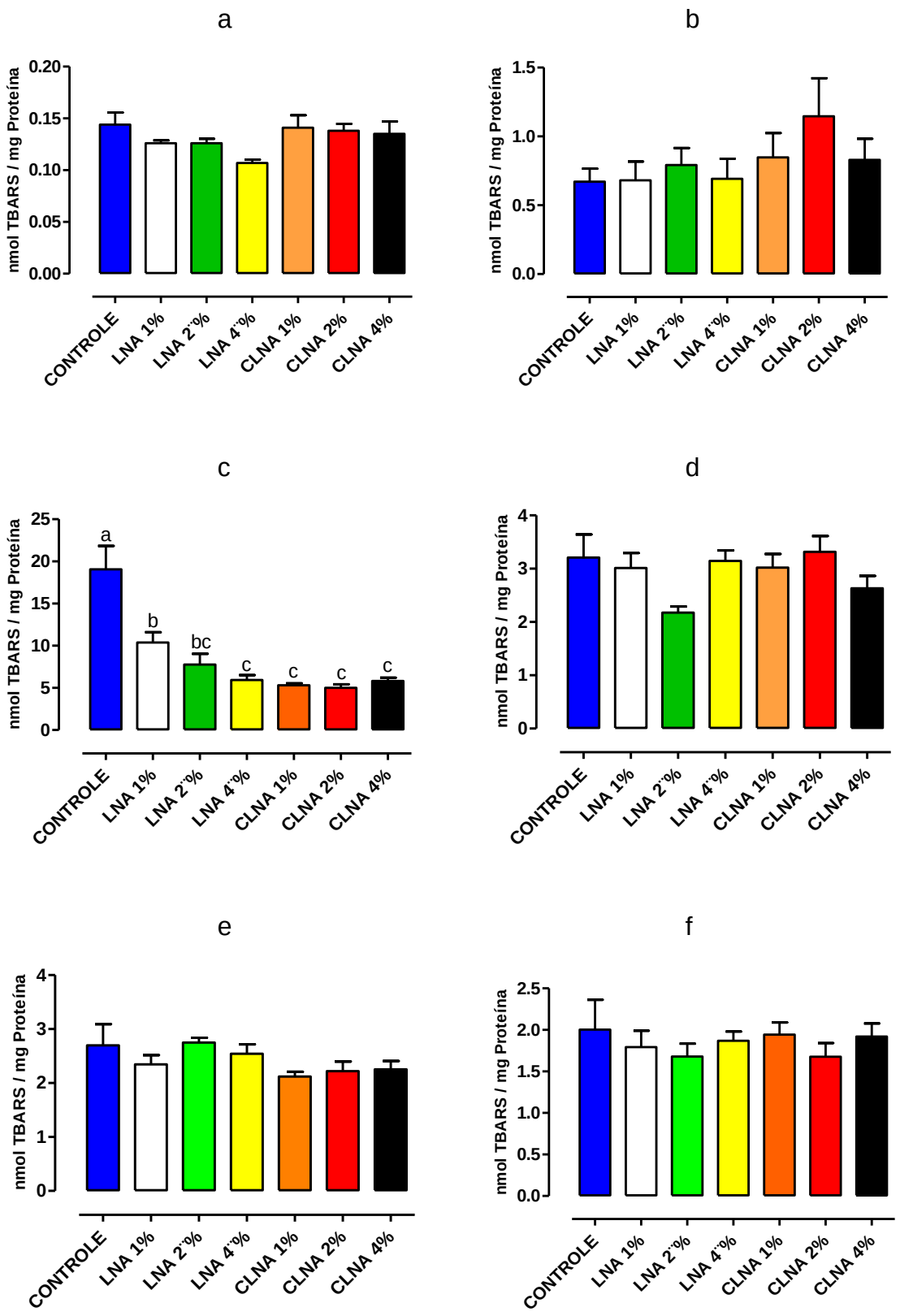


Figura III.12. Efeito sobre a peroxidação lipídica, através da medida de TBARS, de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias: (a) soro, (b) fígado, (c) cérebro ($p<0,01$), (d) músculo gastrocnêmio, (e) coração e (f) rim.

Foi demonstrado que, *in vivo*, os CLNAs aumentaram significativamente o nível de hidroperóxidos no plasma e a oxidação lipídica no fígado; que poderia ser devido a uma menor estabilidade oxidativa dos ácidos graxos conjugados (KOBA et al., 2007; NOGUCHI et al., 2001). Em contrapartida, Dhar et al. (1999) já haviam relatado que o CLNA presente no óleo de semente de *karela* teve ação contra a peroxidação lipídica, utilizando o método de TBARS em ratos alimentados por quatro semanas e que 0,5% de α-ESA nos lipídios da dieta foi a dose ideal. Mukherjee et al. (2002) examinaram a atividade do PA suplementado na dieta de ratos em diferentes concentrações, e também mostrou ser eficiente como antioxidante, com atividade antioxidante máxima na concentração de 0,6% PA. É possível que, nestas condições, CLNAs possa ter reduzido a formação de hidroperóxidos por diminuir a formação de radicais livres e a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados na membrana do eritrócito e outros lipídeos; outra possível explicação pode ser que a bio-hidrogenação ou adição de radical livre em uma das ligações duplas conjugadas de CLNAs poderia ter ocorrido, resultando na formação de dienos que poderia ter agido como antioxidantes (SAHA; GHOSH, 2009; DHAR et al., 1999). Neste trabalho, embora tenham sido encontrados os isômeros dienos conjugados (CLAs) nos tecidos dos animais suplementados com óleo rico em CLNA/PA, não foram observadas alterações nos valores de TBARS do soro e tecidos hepático, muscular, cardíaco e renal desses animais. Alguns autores também relataram que a suplementação com CLAs não altera os níveis de TBARS no soro e fígado de ratos (ANDREOLI et al., 2009; SANTOS-ZAGO; BOTELHO; OLIVEIRA, 2007).

Um fato interessante e, ao mesmo tempo, indagador foi que os níveis de TBARS apresentaram-se reduzidos significativamente (em relação ao controle) no tecido cerebral dos animais que receberam tanto o OL como o PSO. Lembrando que não foram encontradas alterações nos teores de LNA nem a presença de ácidos graxos conjugados no cérebro dos animais suplementados com OL e PSO, respectivamente; assim como não foi observada qualquer outra diferença em relação a composição de ácidos graxos nesse animais em relação ao grupo controle. Isto sugere que os óleos de linhaça e da semente de romã prensados a frio possuem algum componente,

que não os ácidos graxos, que protege o tecido cerebral contra a peroxidação lipídica. Deve-se destacar também a presença da barreira hemato-encefálica, que é seletiva (VALENZUELA, 2008).

4.6 Atividade das enzimas antioxidantes

A geração de espécies reativas ao oxigênio (EROS), tais como ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), durante o metabolismo é um processo essencial e normal no organismo (REENA; LOKESH, 2011). Esta exposição aos EROS propiciou ao organismo desenvolver uma série de mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo induzido por espécies reativas: preventivos, reparadores e de defesas antioxidantes. As defesas antioxidantes enzimáticas incluem três enzimas principais: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx) (VALKO et al., 2007).

A Figura III.13 mostra os resultados da atividade dessas enzimas antioxidantes no tecido hepático dos animais suplementados com OL e PSO. Existiu diferença significativa apenas para os valores da GPx nos grupos que receberam OL 1 e 2% e PSO 4%, que reduziram em relação ao controle.

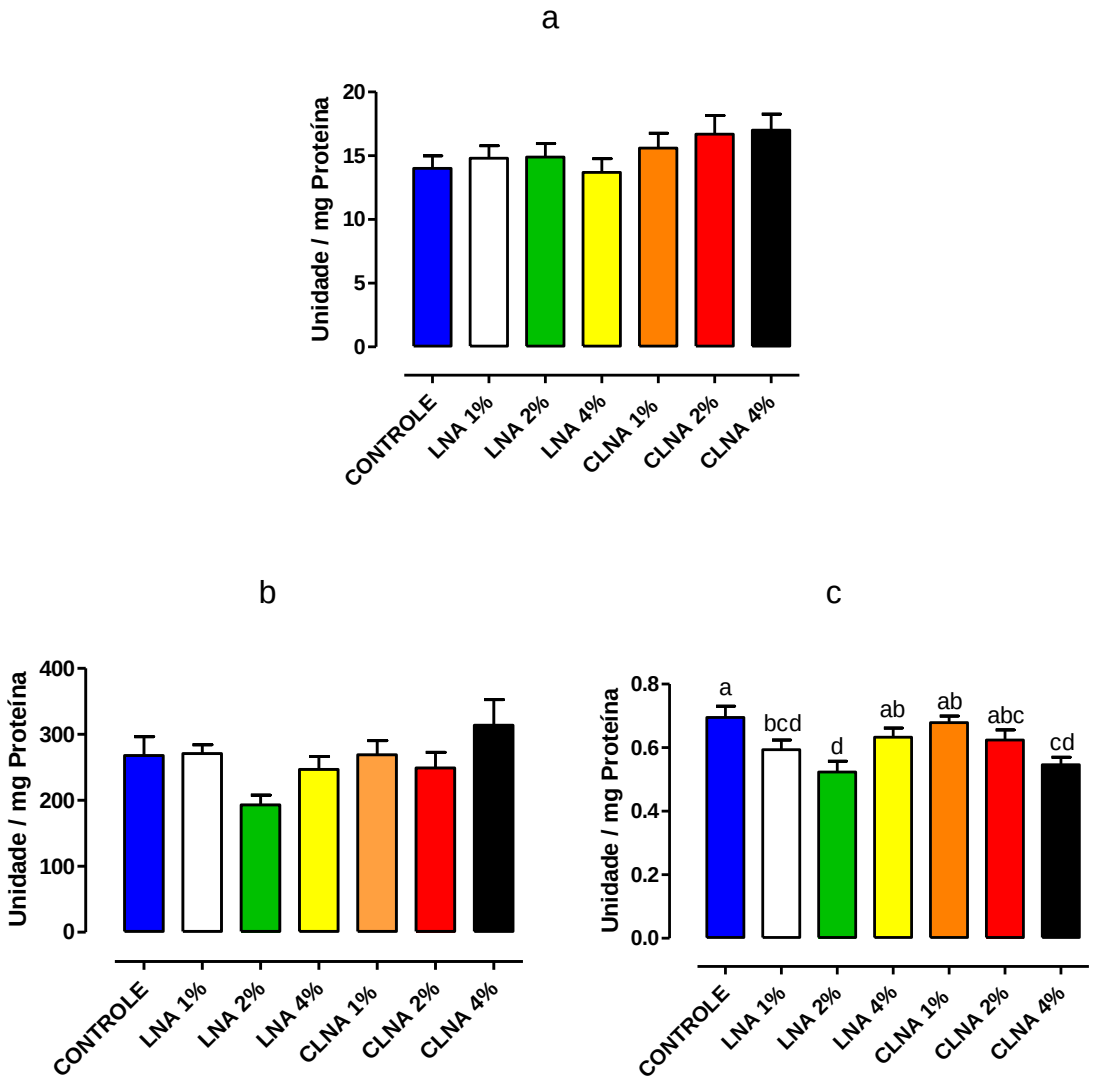


Figura III.13. Atividade das enzimas antioxidantes: (a) superóxido dismutase, (b) catalase e (c) glutationa peroxidase ($p<0,01$), em fígado de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias.

Na Figura III.14 estão apresentados os resultados das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) no cérebro dos animais estudados. Não existiu diferença significativa entre os animais suplementados e o grupo controle para todas as enzimas analisadas. Já para o músculo gastrocnêmio, não existiu diferença entre os grupos estudados com relação à CAT. A GPx apresentou-se reduzida nos grupos OL e PSO na dose de 4%, enquanto que a atividade da SOD reduziu significativamente nos grupos OL 4% e em todos os grupos PSO (1%, 2% e 4%) em relação ao grupo controle (Figura III.15).

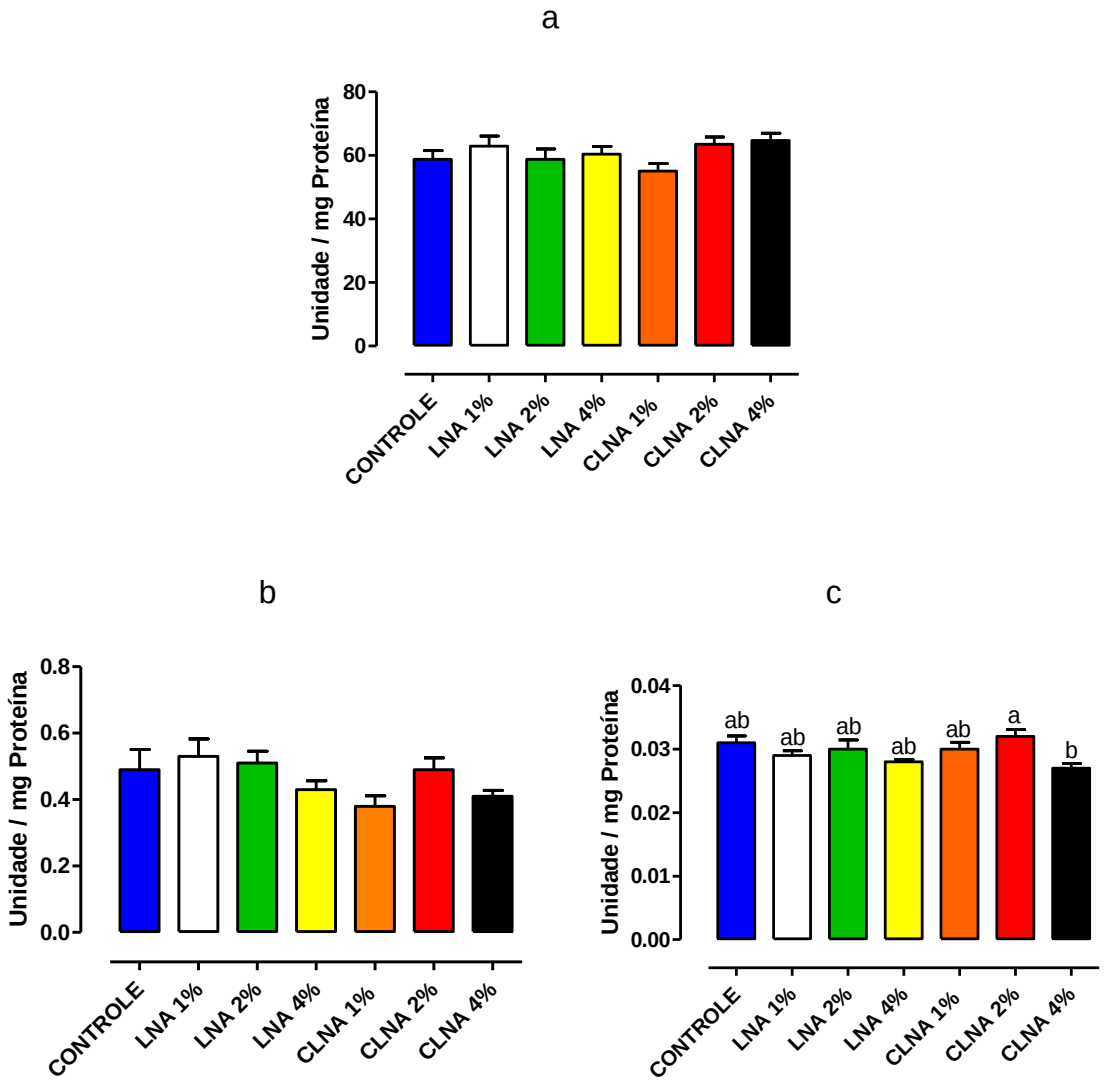


Figura III.14. Atividade das enzimas antioxidantes: (a) superóxido dismutase, (b) catalase e (c) glutationa peroxidase (p=0,01), em cérebro de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias.

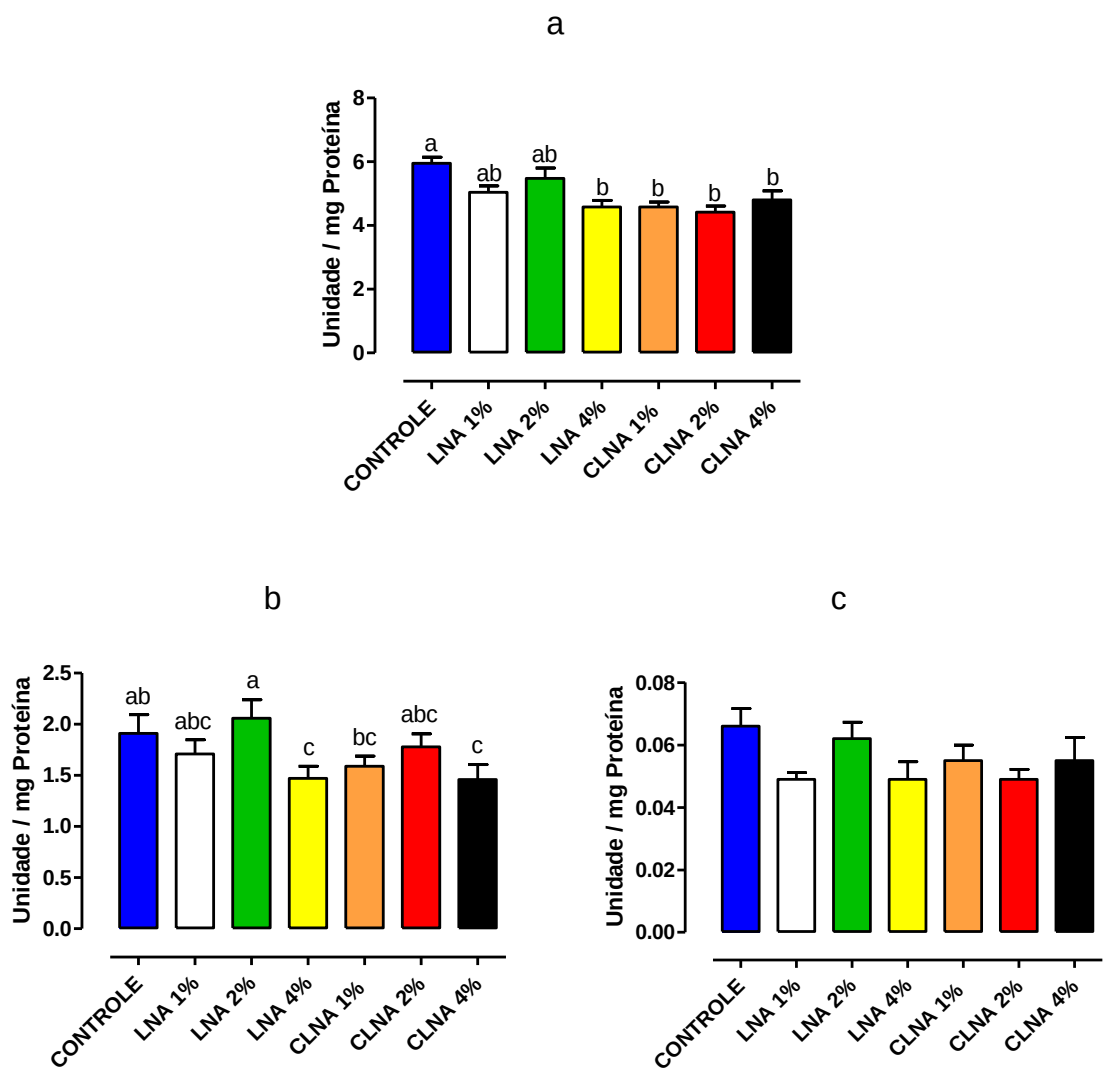


Figura III.15. Atividade das enzimas antioxidantes: (a) superóxido dismutase ($p<0,01$), (b) catalase ($p=0,04$) e (c) glutationa peroxidase, no músculo gastrocnêmio de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias.

Os resultados das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) no coração dos animais estudados podem ser observados na Figua III.16. Houve uma redução em todas as enzimas estudadas para todos os grupos tratados, tanto com OL como com PSO, mas não entre as dose estudadas. Já para o tecido renal, não existiram diferenças entre os grupos estudados com relação à atividade das enzimas antioxidantes, exceto para a atividade da CAT que reduziu no grupo LNA 4% em relação ao controle e LNA 1 e 2% (Figura III.17).

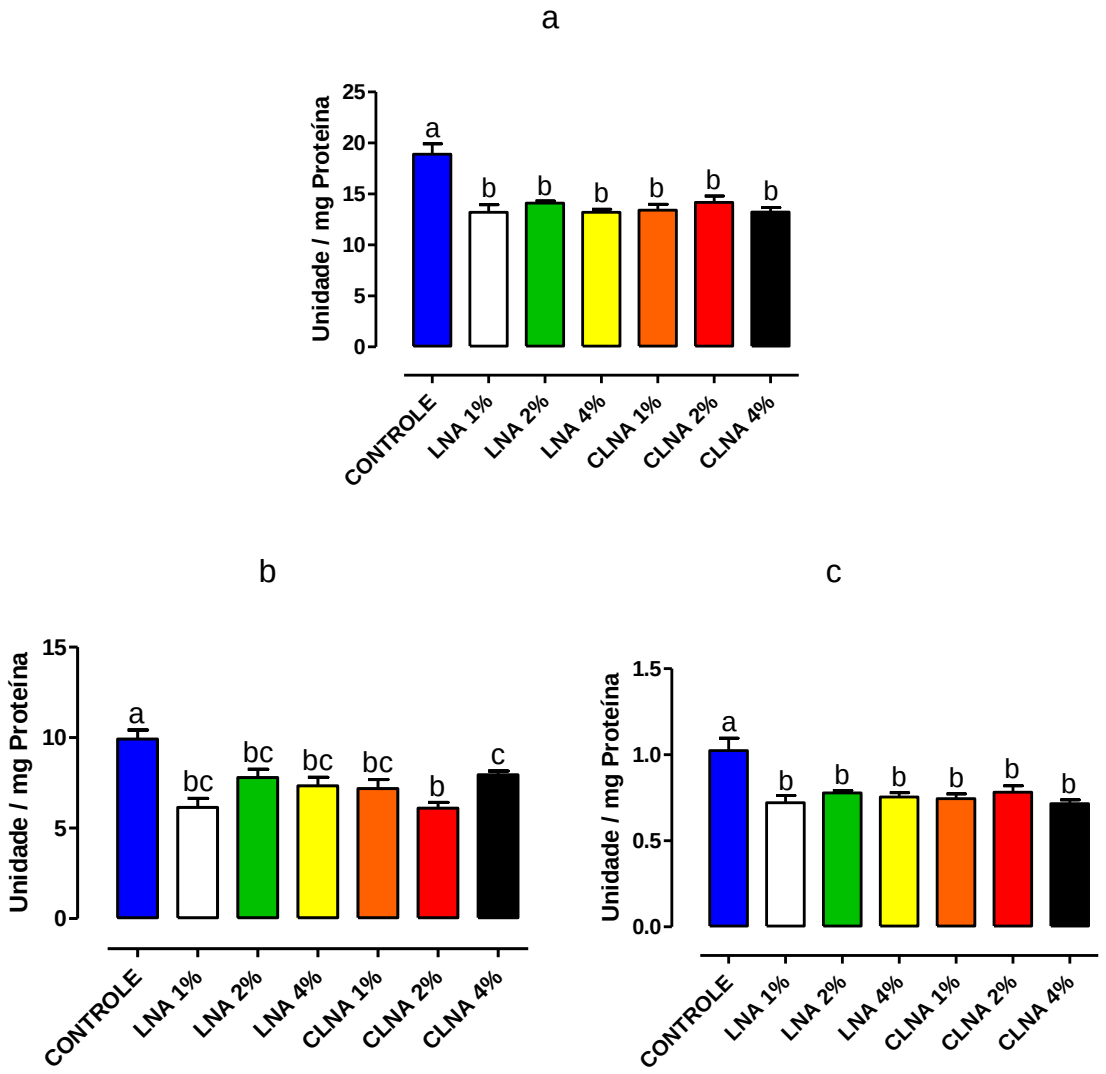


Figura III.16. Atividade das enzimas antioxidantes: (a) superóxido dismutase ($p<0,01$), (b) catalase ($p<0,01$) e (c) glutationa peroxidase ($p=0,03$), no coração de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias.

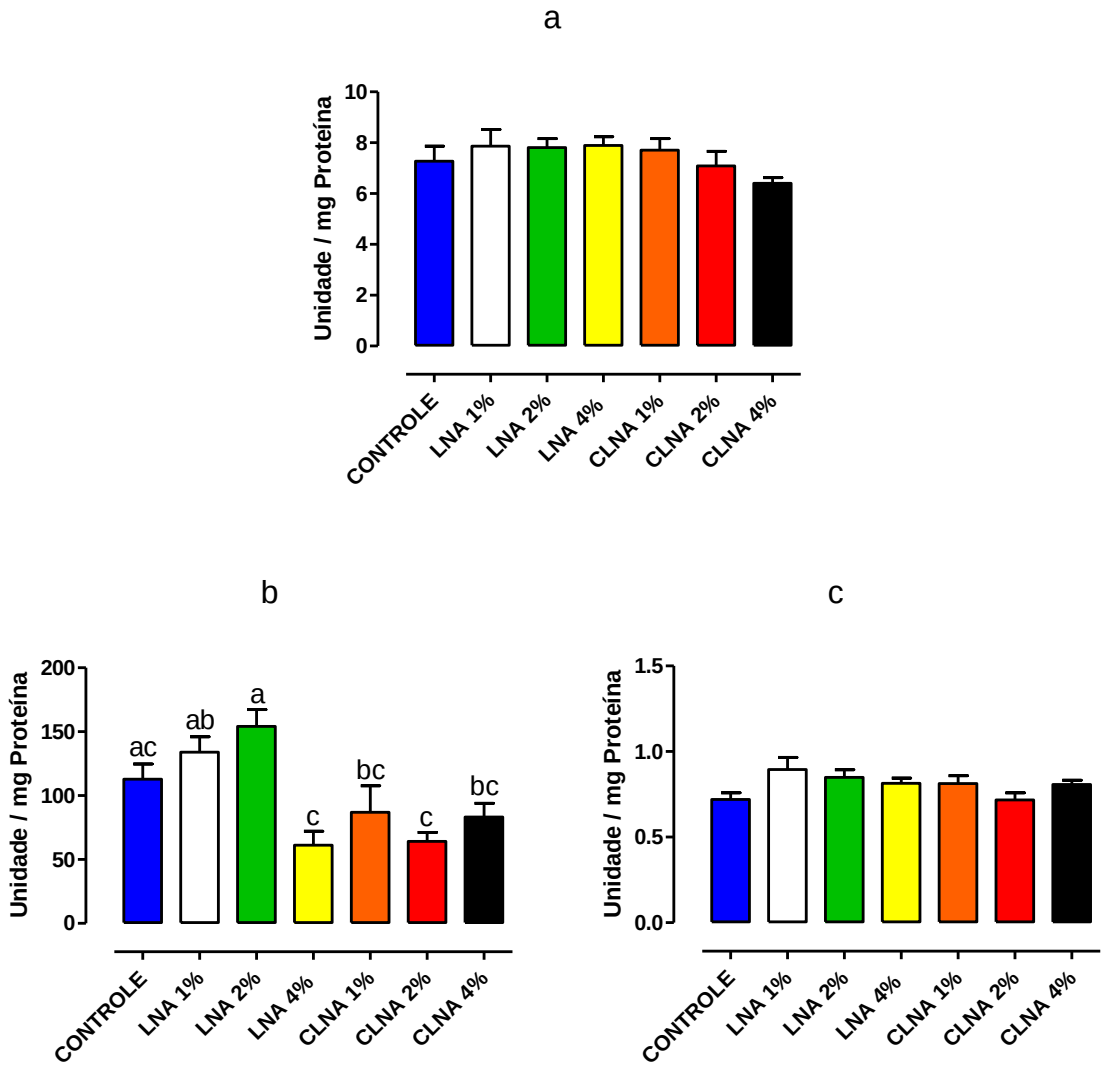


Figura III.17. Atividade das enzimas antioxidantes: (a) superóxido dismutase, (b) catalase (p=0,01) e (c) glutationa peroxidase, no rim de ratos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA) durante 40 dias.

Tem sido relatado que a presença de PUFAs nos lipídeos aumenta a susceptibilidade à oxidação lipídica, sendo necessário, portanto, um aumento na atividade das enzimas antioxidantes para reverter este quadro (REENA; LOKESH, 2011). Estes autores mostraram que ratos suplementados com um óleo rico em PUFAs não conjugados aumenta a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) no tecido hepático em relação ao controle que recebeu óleo rico em ácidos graxos saturados.

De acordo com os resultados apresentados, não foram observadas diferenças significativas na peroxidação lipídica dos tecidos hepático e renal dos animais suplementados com óleos ricos em PUFAs, nem na atividade das enzimas antioxidantes desses tecidos. Já no tecido cerebral, foi possível observar uma redução na peroxidação lipídica em todos os grupos tratados; entretanto, nenhuma diferença foi observada na atividade das enzimas antioxidantes nem na composição de ácidos graxos nesse tecido. Enquanto que a SOD apresentou-se reduzida no músculo gastrocnêmio dos grupos que receberam PSO e todas as enzimas antioxidantes estudadas também estiveram diminuídas no tecido cardíaco de todos os grupos tratados (OL e PSO), quando comparados ao controle; embora, nenhuma alteração tenha sido observada na lipoperoxidação nesses tecidos. Segundo Reena e Lokesh (2011), uma redução na atividade das enzimas antioxidantes pode predispor as células à danos causados pelos radicais livres. Santos-Zago, Botelho e Oliveira (2007) estudaram os efeitos da suplementação de ratos com mix de CLAs (2% em relação ao consumo alimentar) por 42 dias e observaram uma redução significativa na atividade da catalase no soro. Eles concluíram que a redução da atividade da catalase pode indicar menor produção de peróxido que, por sua vez, indicam um menor grau de estresse oxidativo.

Sara e Ghosh (2009) analisaram a influência de dois isômeros de CLNA (0,5% dos lipídios totais ofertado durante 15 dias) na atividade antioxidante contra o estresse oxidativo induzido pelo arsênico. Os resultados mostraram que o arsenito de sódio alterou a atividade das enzimas antioxidantes no plasma e nos homogenatos de fígado e cérebro, enquanto queo α-ESA e o PA aumentarama atividade da SOD, CAT e GPx e diminuiu a atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) para nível normal. No geral, existiram algumas diferenças na efetividade dos dois isômeros, o que é devido ao seu arranjo molecular com ligações *cis-trans* antagônicas. Neste estudo, o α-ESA foi mais eficiente como antioxidante que o PA, devido ao seu maior conteúdo de *trans*. Mas recentemente, esses autores mostraram os mesmos resultados utilizando duas doses dos CLNAs (0,5% e 1% dos lipídios totais ofertado durante 21 dias), mas os resultados não mostraram efeito dose resposta (SAHA; GHOSH, 2011).

Tendo em vista o número reduzido de trabalhos na literatura associados com a atividade antioxidante em organismo animal e os resultados por nós obtidos, indicando uma redução na atividade da enzima SOD no músculo gastrocnêmio e das três enzimas (SOD, CAT e GPx) no coração dos animais que receberam CLNA nas três concentrações, mais estudos são necessários para detalhar a ação do PSO como antioxidante no organismo animal. Os resultados apresentados neste capítulo mostram que o PA presente no PSO é incorporado diferentemente em cada tecido e isto não parece interferir na atividade antioxidante dos mesmos, estas também apresentadas de formas diferentes entre os tecidos.

4.7 Análises de correlação e estatística multivariada

A análise de correlação linear entre as variáveis mostrou alguns resultados interessantes:

- ✓ Houve uma correlação positiva e significante entre o coleterol total no soro e o HDL-colesterol (r=0,875, p=0,010), e estas duas variáveis esteve correlacionadas positivamente com os níveis de TBARS no soro (r=0,917, p=0,004; r=0,8507, p=0,015; respectivamente);
- ✓ Foi observada uma correlação negativa para o conteúdo de lipídeos totais e os valores de TBARS no cérebro nos animais (r=-0,8951, p=0,006);
- ✓ O conteúdo de glicose no soro foi correlacionado positivamente com as enzimas antioxidantes (CAT: r=0,751, p=0,052; e GPx: r=0,748, p=0,053) do rim;
- ✓ O diâmetro dos adipócitos foi correlacionado positivamente e significativamente tanto com o conteúdo de CLAs como de CLNAs nos tecidos muscular e adiposos, com valores de r em torno de 0,81 e p<0,05.

Com intuito de verificar associações entre as características do ganho de peso corpóreo, lipidograma, glicose sérica, conteúdo total de lipídeos e o estado antioxidante nos tecidos (fígado, cérebro, coração e rim) dos ratos incluídos no grupo controle, LNA e CLNA, a Análise por Componentes Principais (ACP) e a Análise Hierárquica de Agrupamentos (AHA) foram aplicadas aos dados previamente auto-escalados, conforme mostram as Figuras III.18 e III.19.

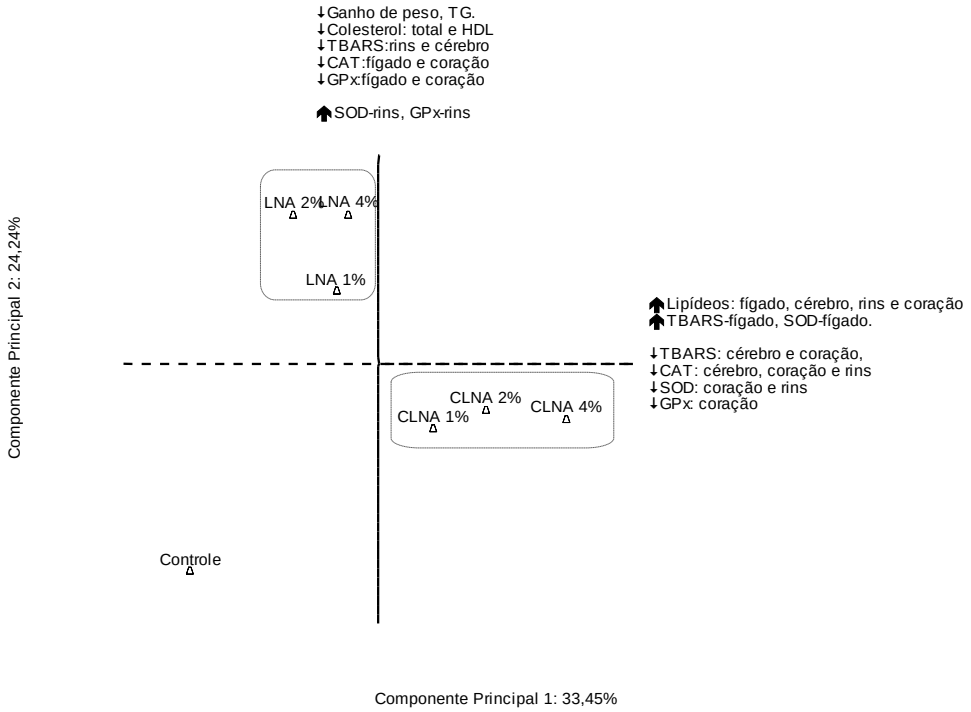


Figura III.18. Análise por Componentes Principais (PC1 x PC2) para mostrar diferenças nos parâmetros avaliados entre os grupos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA).

.

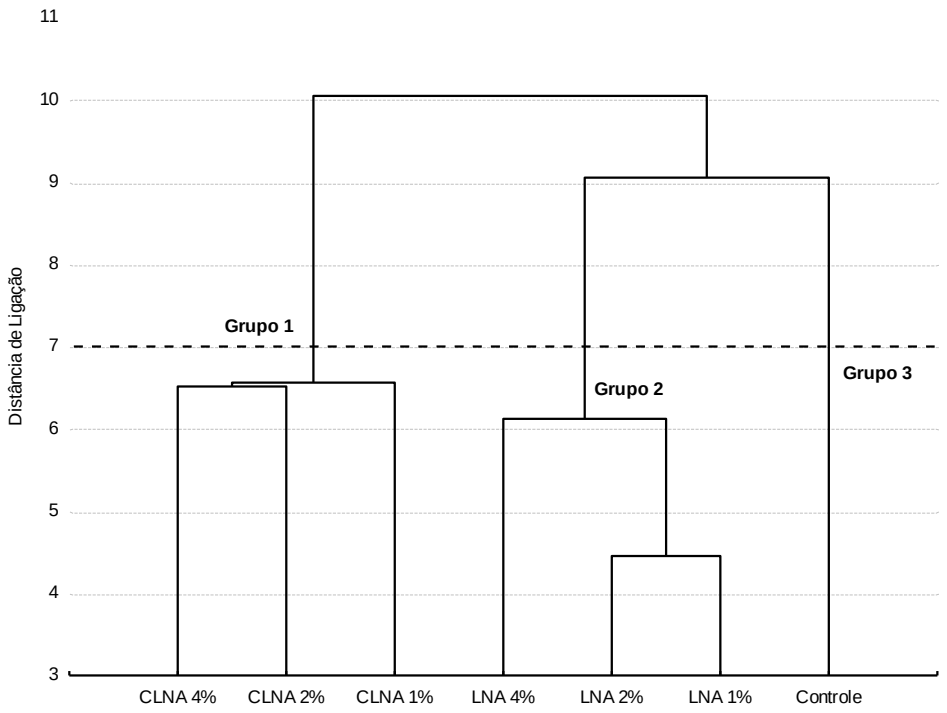


Figura III.19. Análise Hierárquica de Agrupamentos para os grupos tratados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA).

A ACP e a AHA foram utilizadas para visualizar melhor os resultados obtidos experimentalmente, uma vez que há muitas variáveis de resposta envolvidas no processo de avaliação de funcionalidade dos óleos de linhaça e da semente de romã. De acordo com as figuras apresentadas, podemos observar que os grupos estão dispostos separadamente nos quadrantes de acordo com a suplementação e independente da dose, com uma variância cumulativa de 57,68%; enfatizando a formação de grupos com características semelhantes, de acordo com variáveis de resposta selecionadas. Pode-se observar que o óleo de linhaça apresenta melhor efeito benéfico por está envolvido no aumento da SOD e GPx nos rins, além de englobar menor ganho de peso, triglicerídeos, colesterol total, HDL séricos e TBARS no rim e cérebro. Enquanto o óleo da semente de romã está no quadrante que explica maior quantidade de lipídeos nos tecidos e de TBARS no fígado.

Uma segunda análise de ACP e AHA foi realizada para avaliar associações entre as características estudadas nos tecidos muscular e adiposos, apresentados na Figuras III.20 e III.21.

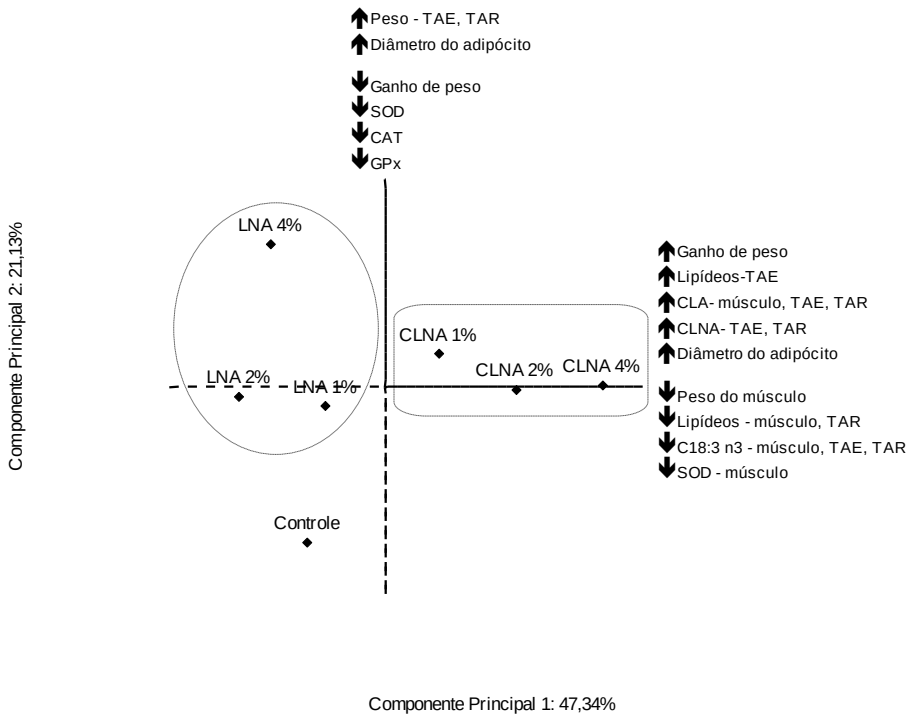


Figura III.20. Análise por Componentes Principais (PC1 x PC2) para mostrar diferenças nos parâmetros avaliados entre os grupos suplementados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA).

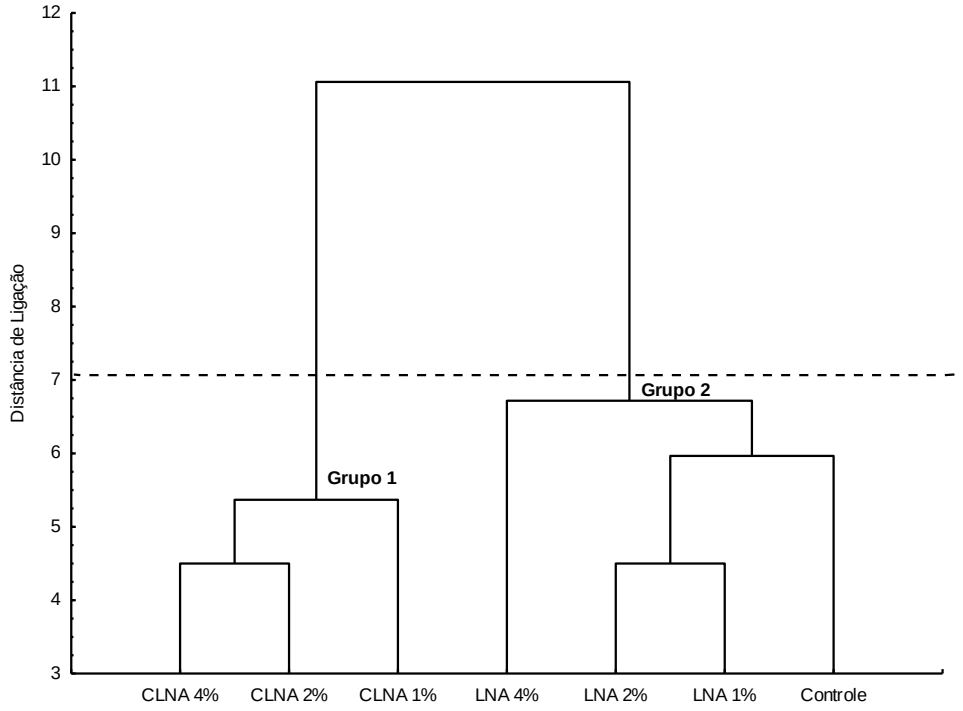


Figura III.21. Análise Hierárquica de Agrupamentos para os grupos tratados com os óleos de linhaça (grupo LNA) e da semente de romã (grupo CLNA).

De acordo com as figuras apresentadas, podemos observar que os grupos estão dispostos separadamente, com uma variância cumulativa de 68,47%, principalmente os grupos que receberam óleo da semente de romã (grupo CLNA). De acordo com esta análise podemos obeservar que o CLNA está envolvido com maior ganho de peso, maior diâmetro do adipócito e menor peso do músculo. Estes resultados mostram que em ratos saudáveis, a suplementação com CLNA nas condições aqui apresentadas não apresenta o efeito benéfico de redução de tecido adiposo nem aumento da massa magra.

5 CONCLUSÕES

A suplementação com OL e PSO não afetou significativamente o ganho de peso corpóreo, o ganho de peso dos tecidos muscular e adiposo, a resposta ao teste oral de tolerância à glicose e nem nos níveis de glicose, triglicerídeos, colesterol total (CT), HDL-colesterol, alanina e aspartato aminotransferases no soro. Exceto, os níveis de CT que reduziram significativamente nos animais suplementados com OL nas doses de 2% e 4%.

O OL foi capaz de aumentar a porcentagem de LNA em todos os tecidos, de maneira dose dependente, enquanto o ácido punícico (CLNA) foi encontrado em quantidades traços, sendo metabolizado e incorporado na forma de CLAs, principalmente do isômero C18:2-9*c*11*t*. Uma exceção foi o tecido cerebral que foi protegido contra qualquer alteração no seu perfil de ácidos graxos. A maior incorporação de CLA foi notada no tecido adiposo, seguido do hepático, renal, cardíaco e muscular. Os resultados sugerem que o CLNA presente no PSO é metabolizado a CLA e incorporado de formas diferentes dependendo do tecido.

O aumento na concentração de LNA e/ou de CLNAs não interferiu de maneira significativa na lipoperoxidação e na atividade das enzimas antioxidantes nos tecidos hepático, muscular e renal. No tecido cerebral, a suplementação tanto com o OL como com o PSO reduziu significativamente os teores de TBARS, quando comparados ao grupo controle; efeito que parece

ser independente dos CLAs/CLNAs e da atividade das enzimas antioxidantes, pois estas não apresentaram-se alteradas. Já no tecido cardíaco, apesar de não haver alteração na lipoperoxidação, a atividade das enzimas antioxidantes esteve reduzida em todos os grupos suplementados, tanto com OL como com o PSO, indicando que este efeito também não é dependente do acúmulo de isômeros de ácidos graxos conjugados.

Os efeitos da suplementação com PSO no organismo ainda são controversos e escassos em algumas áreas. Nossos achados mostram que o PSO pode ser utilizado como fonte de CLAs para o organismo, porém não provoca alterações no metabolismo lipídico e não interfere consideravelmente na atividade antioxidante de animais saudáveis, exceto a ação positiva em reduzir os níveis de TBARS no cérebro; efeito independente dos CLAs/CLNA. Os resultados aqui apresentados colaboram com mais informações a respeito dos efeitos da suplementação com CLNAs em ratos, contribuindo com a literatura a cerca do uso dos conjugados em organismos saudáveis, ajudando na compilação dos dados a fim de estabelecer os efeitos reais desses ácidos graxos nos organismos e direcionando para a necessidade de estudos que avaliem o mecanismo de ação desses ácidos graxos.

6 REFERÊNCIAS

AKPOLAT, M.; KANTER, M.; TOPCU-TARLADACALISIR, Y.; AYDOGDU, N. Protective effect of flaxseed oil on renal injury in hyperlipidaemic rats: the effect of flaxseed oil on hyperlipidaemia. **Phytotherapy Research**, v.25, p.796-802, 2011.

ALI, Y.M.; KADIR, A.A.; AHMAD, Z.; YAAKUB, H.; ZAKARIA, Z.A.; ABDULLAH, M.N.H. Free radical scavenging activity of conjugated linoleic acid as single or mixed isomers. **Pharmaceutical Biology**, v.50, p.712-719, 2012.

ANDREOLI, M.F.; GONZALEZ, M.A.; MARTINELLI, M.I.; MOCCHIUTTI, N.O.; BERNAL, C.A. Effects of dietary conjugated linoleic acid at high-fat levels on triacylglycerol regulation in mice. **Nutrition,** v.25, p.445–452, 2009.

ARAO, K.; WANG, Y.M.; INOUE, N.; HIRATA, J.; CHA, J.Y.; NAGAO, K.; YANAGITA T. Dietary effect of pomegranate seed oil rich in 9*cis*, 11*trans*, 13*cis* conjugated linolenic acid on lipid metabolism in obese, hyperlipidemic OLETF Rats. **Lipids in Health and Disease**, v.3, p.24-30, 2004[a].

ARAO, K.; YOTSUMOTO, H.; HAN, S.Y.; NAGAO, K.; YANAGITA, T. The 9*cis*, 11*trans*, 13*cis* isomer of conjugated linolenic acid reduces apolipoprotein B100 secretion and triacylglycerol synthesis in HepG2 cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.68, p.2643-2645, 2004[b].

BAUBLITS, R.T.; POHLMAN, F.W.; BROWN JR., A.H.; JOHNSON, Z.B.; PROCTOR, A.; SAWYER, J.; DIAS-MORSE, P.; GALLOWAY, D.L. Injection of conjugated linoleic acid into beef strip loins. **Meat Science**, v.75, p.84-93, 2007.

BENJAMIN, S.; SPENER, F. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. **Nutrition & Metabolism**, v.6, p. 36-48, 2009.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism**: a manual of biochemical methods. 2.ed. New York, London: Grune & Stratton, 1975. p.89-90.

BISSONAUTH, V.; CHOUINARD, Y.; MARIN, J.; LEBLANC, N.; RICHARD, D.; JACQUES, H. The effects of t10,c12 CLA isomer compared with c9,t11 CLA isomer on lipid metabolism and body composition in hamsters. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v.17, p.597-603, 2006.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.677-685, 1985.

CAO, Y.; CHEN, J.; YANG, L.; CHEN, Z.Y. Differential incorporation of dietary conjugated linolenic and linoleic acids into milk lipids and liver phospholipids in lactating and suckling rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.20, p.685-693, 2009.

CARVALHO, E.B.T.; MELO, I.L.P.; MANCINI-FILHO, J. Chemical and physiological aspects of isomers of conjugated fatty acids. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, p.295-307, 2010.

CHRISTIE, W.W.; SÉBÉDIO, J.L.; JUANÉDA, P. A practical guide to the analysis of conjugated linoleic acid (CLA). **Inform**, v.12, p.147-152, 2001.

CORREIA, P.R.M., FERREIRA, M.M.C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v.30, p.481-487, 2007.

DHAR, P.; BHATTACHARYYA, D.; BHATTACHARYYA, D. K.; GHOSH, S. Dietary Comparison of Conjugated Linolenic Acid (9 *cis*, 11 *trans*, 13 *trans*) and a-Tocopherol Effects on Blood Lipids and Lipid Peroxidation in Alloxan-Induced Diabetes Mellitus in Rats. **Lipids**, v.41, p.49-54, 2006.

DHAR, P.; GHOSH, S.; BHATTACHARYYA, D. K. Dietary effects of conjugated octadecatrienoic fatty acid (9*cis*, 11*trans*, 13*trans*) levels on blood lipids and nonenzymatic *in vitro* lipid peroxidation in rats. **Lipids**, v.34, p. 109-114, 1999.

ELFALLEH, W.; YING, M.; NASRI, N.; SHENG-HUA, H.; GUASMI, F.; FERCHICHI, A. Fatty acids from Tunisian and Chinese pomegranate (*Punica grantum* L.) seeds. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.62, p.200-206, 2011.

FA, M.; DIANA, A.; CARTA, G.; CORDEDDU, L.; MELIS, M.P.; MURRU, E.; SOGOS, V.; BANNI, S. Incorporation and metabolism of *c*9,*t*11 and *t*10,*c*12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers in rat brain. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1736, p.61-66, 2005.

FEITOZA, A.B.; PEREIRA, A.F.; COSTA, N.F.; RIBEIRO, B.G. Conjugated linoleic acid (CLA): effect modulation of body composition and lipid profile. **Nutrición Hospitalaria**, v.24, p.422-428, 2009.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids. **The Journal of Biological Chemistry**, v.226, p.497-509, 1957.

FREIRE, T.O.; GUALANO, B.; LEME, M.D.; OLACOW, V.O.; LANCHA JR, A.H. Efeitos da Suplementação de Creatina na Captação de Glicose em Ratos Submetidos ao Exercício Físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.14, p.431-435, 2008.

GOEDECKE, J.H.; RAE, D.E.; SMUTS, C.M.; LAMBERT, E.V.; O'SHEA, M. Conjugated Linoleic Acid Isomers, *t*10*c*12 and *c*9*t*11, are Differentially Incorporated into Adipose Tissue and Skeletal Muscle in Humans. **Lipids,** v.44, p.983-988, 2009.

GROSSMANN, M.E.; MIZUNO, N.K.; DAMMEN, M.L.; SCHUSTER, T.; RAY, A.; CLEARY, M.P. Eleostearic acid inhibits breast cancer proliferation by means of an oxidation-dependent mechanism. **Cancer Prevention Research**, v.2, p.879-886, 2009.

GROSSMANN, M.E.; MIZUNO, N.K.; SCHUSTER, T.; CLEARY, M.P. Punicic acid is an ω-5 fatty acid capable if inhibiting breast cancer proliferation. **International Journal of Oncology**, v.36, p.421-426, 2010.

HONTECILLAS, R.; DIGUARDO, M.; DURAN, E.; ORPI, M.; BASSAGANYA-RIERA, J. Catalpic acid decreases abdominal fat deposition, improves glucose homeostasis and upregulates PPAR α expression in adipose tissue. **Clinical Nutrition**, v.27, p.764-772, 2008.

HONTECILLAS, R.; O'SHEA, M.; EINERHAND, A.; DIGUARDO, M.; BASSAGANYA-RIERA, J. Activation of PPAR γ and α by Punicic Acid Ameliorates Glucose Tolerance and Suppresses Obesity-Related Inflammation. **Journal of the American College of Nutrition**, v.28, p.184-195, 2009.

IGARASHI, M.; MIYAZAWA, T. Newly recognized cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on cultured human tumor cells. **Cancer Letters**, v.148, p.173-179, 2000.

IGARASHI, M.; MIYAZAWA, T. Preparation and fractionation of conjugated trienes from alpha-linolenic acid and their growth-inhibitory effects on human tumor cells and fibroblasts. **Lipids**, v.40, p.109-113, 2005.

KENNEDY, A.; MARTINEZ, K.; SCHMIDT, S.; MANDRUP, S.; LAPOINTA, K.; MCINTOSHA, M. Antiobesity mechanisms of action of conjugated linoleic acid. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.21, p.171-179, 2010.

KOBA, K.; AKAHOSHI, A.; YAMASAKI, M.; TANAKA, K.; YAMADA, K; IWATA, T.; KAMEGAI, T; TSUTSUMI, K; SUGANO, M. Dietary Conjugated Linolenic Acid in Relation to CLA Differently Modifies Body Fat Mass and Serum and Liver Lipid Levels in Rats. **Lipids**, v.34, p.343-350, 2002.

KOBA, K.; BELURY, M.A.; SUGANO, M. Potential health benefits of conjugated trienoic acids. **Lipid Technology**, v.19, p.200-203, 2007.

KOBA, K.; IMAMURA, J.; AKASHOSHI, A.; KOHNO-MURASE, J.; NISHIZONO, S.; IWABUCHI, M.; TANAKA, K.; SUGANO, M. Genetically Modified Rapeseed Oil Containing *cis*-9, *trans*-11, *cis*-13-Octadecatrienoic Acid Affects Body Fat Mass and Lipid Metabolism in Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.3741-3748, 2007.

KOHNO, H.; SUZUKI, R.; YASUI, Y.; HOSOKAWA, M.; MIYASHITA, K.; TANAKA, T. Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats. **Cancer Science**, v.95, p.481-486, 2004.

LAM, C.K.; CHEN, J.; CAO, Y.; YANG, L.; WONG, Y.M.; YEUNG, S.Y.V.; YAO, X.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y. Conjugated and non-conjugated octadecaenoic acids affect differently intestinal acyl coenzyme A: Cholesterol acyltransferase activity. **Atherosclerosis**, v.198, p.85-93, 2008.

LIMA, F.B.; MACHADO, U.F.; BARTOL, I.; SERAPHIM, P.M.; SUMIDA, D.H.; MORAES, S.M.; HELL, N.S.; OKAMOTO, M.M.; SAAD, M.J.; CARVALHO, C.R.; CIPOLLA-NETO, J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. **American Journal Physiology,** v.275, p.E934-941, 1998.

LOPES, P.A.; MARTINS, S.V.; PINHO, M.S.; ALFAIA, C.M.; FONTES, C.M.G.A.; RODRIGUES, P.O.; MORAIS, G.S.L.; CASTRO, M.F.; PINTO, R.; PRATES, J.A.M. Diet supplementation with the *cis*-9,*trans*-11 conjugated linoleic acid isomer affects the size of adipocytes in Wistar rats. **Nutrition Research,** v.28, p.480-486, 2008.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase, an enzyme function for erythrhrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v.244, p.6049-6055, 1969.

McFARLIN, B.K.; STROHACKER, K.A.; KUEHT, M.L. Pomegranate seed oil consumption during a period of high-fat feeding reduces weight gain and reduces type 2 diabetes risk in CD-1 mice. **British Journal of Nutrition**, v.102, p.54-59, 2009.

MIRANDA, J.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; MACARULLA, M.T.; CHURRUCA, I.; GARCÍA, C.; RODRÍGUEZ, V.M.; SIMÓN, E.; PORTILHO, M.P. A comparison between CLNA and CLA effects on body fat, serum parameters and liver composition. **The Journal of Physiology and Biochemistry**, v.65, p.25-32, 2009.

MIRMIRAN, P.; FAZELI, M.R.; ASGHARI, G.; SHAFIEE, A.; AZIZI, F. Effect of pomegranate seed oil on hyperlipidaemic subjects: a double-blind placebo-controlled clinical Trial. **British Journal of Nutrition**, v.104, p.402-206, 2010.

MUKHERJEE, C.; BHATTACHARYYA, S.; GHOSH, S.; BHATTACHARYYA, D.K. Dietary Effects of Punicic Acid on the Composition and Peroxidation of Rat Plasma Lipid. **Journal of Oleo Science**, v.51, p.513-522, 2002.

NEMER, K. **The Role of Punicic Acid (c9t11c13-CLNA) in Lipid and Energy Metabolism of Mice.** 18f. A Senior Honors Research Thesis - The Ohio State University, Ohio, 2009.

NOGUCHI, R.; YASUI, Y.; SUZUKI, R.; HOSOKAWA, M.; FUKUNAGA, K.; MIYASHITA, K. Dietary Effects of Bitter Gourd Oil on Blood and Liver Lipids of Rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.396, p.207-212, 2001.

OBSEN, T.; FAERGEMAN, N.J.; CHUNG, S.; MARLINEZ, K.; GOBERN, S.; LOREAU, O.; WABITSCH, M.; MANDRUP, S.; McINTOSH, M. *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid decreases *de novo* lipid synthesis in human adipocytes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.23, p.580-590, 2012.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v.95, p.351-358, 1979.

PARK, Y. Conjugated linoleic acid (CLA): Good or bad *trans* fat? **Journal of food composition and analysis,** v.22, p.S4-S12, 2009.

QUEIROZ, J.C.F.; ALONSO-VALE, M.I.; CURI, R.; LIMA, F.B. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.53, p.582-594, 2009.

RAHMAN, M.M.; HALADE, G.V.; JAMALI, A.E.; FERNANDES, G. Conjugated linoleic acid (CLA) prevents age-associated skeletal muscle loss. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v.383, p.513-518, 2009.

RENNA, M.B.; LOKESH, B.R. Effect of feeding blended and interesterified vegetable oils on antioxidant enzymes in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.136-146, 2011.

RODBELL, M. Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. **Journal Biology Chemistry,** v.239, p.375-380, 1964.

SAHA, S.S.; GHOSH, M. Antioxidant effect of vegetable oils containing conjugated linolenic acids isomers against induced tissue lipid peroxidation and inflammation in rat model. **Chemico-Biological interactions,** v.190, p.109-120, 2011.

SAHA, S.S.; GHOSH, M. Comparative study of antioxidant activity of α-eleostearic acid and punicic acid against oxidative stress generated by sodium arsenite. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.2551-2556, 2009.

SANTOS-ZAGO, L.F.; BOTELHO, A.P.; OLIVEIRA, A.C. Os efeitos do ácido linoléico conjugado no metabolismo animal: avanço das pesquisas e perspectivas para o futuro. **Revista de Nutrição**, v.21, p.195-221, 2008.

SANTOS-ZAGO, L.F.; BOTELHO, A.P.; OLIVEIRA, A.C. Supplementation with commercial mixtures of conjugated linleic acid in association with vitamin E and processo f lipid autoxidation in rats. **Lipids,** v.42, p.845-854, 2007.

SANTOS-ZAGO, L.F.; BOTELHO, A.P.; OLIVEIRA, A.C.; MARÓSTICA-JUNIOR, M.R. Conjugated linoleic acid supplementation: lipid content and hepatic histology in healthy Wistar rats. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.31, p.141-146, 2011.

SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO E.; BOVERIS A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Letters**, v.103, p.287-290, 1979.

SOUZA, A.M.; POPPI, R.J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, v.35, p.223-229, 2012.

SUZUKI, R.; NOGUCHI, R.; OTA, T.; ABE, M.; MIYASHITA, K.; KAWADA, T. Cytotoxic Effect of Conjugated Trienoic Fatty Acids on Mouse Tumor and Human Monocytic Leukemia Cells. **Lipids**, v.36, p.477-482, 2001.

TRAN, H.N.A.; BAE, S.Y.; SONG, B.H.; LEE, B.H.; BAE, Y.S; KIM, Y.H.; LANSKY, E.P.; NEWMAN, R.A. Pomegranate (*punica granatum*) seed linolenic acid isomers: concentration-dependent modulation of estrogen receptor activity. **Endocrine Research**, v.35, p.1-16, 2010.

TSUZUKI, T.; IGARASHI, M.; IWATA, T.; YAMAUCHI-SATO, Y.; YAMAMOTO, T.; OGITA, K.; SUZUKI, T.; MIYAZAWA, T. Oxidation rate of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid is slowed by triacylglycerol esterification and α-tocopherol. **Lipids**, v.39, p.475-480, 2004[a].

TSUZUKI, T.; KAWAKAMI, Y. Tumor angiogenesis suppression by α-eleostearic acid, α linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via peroxisome proliferator-activated receptor γ. **Carcinogenesis**, v.29, p.797-806, 2008.

TSUZUKI, T.; KAWAKAMI, Y.; ABE, R.; NAKAGAWA, K.; KOBA, K.; IMAMURA, J.; IWATA, T.; IKEDA, I.; MIYAZAWA, T. Conjugated Linolenic Acid Is Slowly Absorbed in Rat Intestine, but Quickly Converted to Conjugated Linoleic Acid. **The Journal of Nutrition**, v.136, p.2153-2159, 2006.

TSUZUKI, T.; TOKUYAMA, Y.; IGARASHI, M.; MIYAZAWA, T. Tumor growth suppression by α-eleostearic acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via lipid peroxidation. **Carcinogenesis**, v.25, p.1417-1425, 2004[b].

TZANG, B.S.; YANG, S.F.; FU, S.G.; YANG, H.C.; SUN, H.L.; CHEN, Y.C. Effects of dietary flaxseed oil on cholesterol metabolism of hamsters. **Food Chemistry**, v.114, p.1450-1455, 2009.

VALENZUELA B. A. Ácidos grasos con Isomería *trans* I. Su origen y los efectos en la salud humana. **Revista Chilena de Nutricíon,** v.35, p.162-171, 2008.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.44-84, 2007.

VROEGRIJK, I.O.; VAN DIEPEN, J.A.; VAN DEN BERG S.; WESTBROEK, I.; KEIZER, H.; GAMBELLI, L.; HONTECILLAS, R.; BASSAGANYA-RIERA, J.; ZONDAG, G.C.; ROMIJN, J.A.; HAVEKES, L.M.; VOSHOL, P.J. Pomegranate seed oil, a rich source of punicic acid, prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.1426-1430, 2011.

VYAS, D.; KADEGOWDA, A.K.G.; ERDMAN, R.A. Dietary conjugated linoleic acid and hepatic steatosis: species-specific effects on liver and adipose lipid metabolism and gene expression. **Journal of Nutrition and Metabolism**, 2012 (*in press*). (doi: 10.1155/2012/932928)

YAMASAKI, M.; KITAGAWA, T.; KOYANAGI, N.; CHUJO, H.; MAEDA, H.; KOHNO-MURASE, J.; IMAMURA, J.; TACHIBANA, H.; YAMADA, K. Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice. **Nutrition**, v.22, p.54-59, 2006.

YANG, L.; CAO, Y.; CHEN, J.N.; CHEN, Z.Y. Oxidative Stability of Conjugated Linolenic Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.10, p.4212-4217, 2009.

YANG, L.; LEUNG, K.Y.; CAO, Y.; HUANG, Y.; RATNAYAKE, W.M.N.; CHEN, Z.Y. α-Linolenic acid but not conjugated linolenic acid is hypocholesterolaemic in hamsters. **British Journal of Nutrition**, v.93, p.433-438, 2005.

YASUI, Y.; HOSOKAWA, M.; SAHARA, T.; SUZUKI, R.; OHGIYA, S.; KOHNO, H.; TANAKA, T.; MIYASHITA, K. Bitter gourd seed fatty acid rich in 9*c*,11*t*,13*t* conjugated linolenic acid induces apoptosis and up-regulates the GADD45, p53 and PPARγ in human colon cancer Caco-2 cells. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.73, p.113-119, 2005.

YU, L. Free Radical Scavenging Properties of Conjugated Linoleic Acids. **Journal of Agriculture Food Chemistry,** v.49, n.7, p.3452−3456, 2001.

YUAN, G.F.; SINCLAIR, A.J.; SUN, H.Y.; Li, D. Fatty acid composition in tissues of mice fed diets containing conjugated linolenic acid and conjugated linoleic acid. **Journal of Food Lipids**, v.16, p.148-163, 2009[a].

YUAN, G.F.; SINCLAIR, A.J.; XU, C.; LI, D. Incorporation and metabolism of punicic acid in healthy young humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.53, p.1336-1342, 2009[b].

YUAN, G.F.; SINCLAIR, A.J.; ZHOU, C.Q.; Li, D. *α*-Eleostearic acid is more effectively metabolized into conjugated linoleic acid than punicic acid in mice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.89, p.1006–1011, 2009[c].

YUAN, G.F.; SUN, H.; SINCLAIR, A.J.; Li, D. Effects of conjugated linolenic acid and conjugated linoleic acid on lipid metabolism in mice. **European Journal of Lipid Science *and* Technology**, v.111, p.537-545, 2009[d].

YUAN, G.F.; WAHLQVIST, M.L.; YUAN, J.Q.; WANG, Q.M.; LI, D. Effect of punicic acid naturally occurring in food on lipid peroxidation in healthy young humans. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.89, p.2331-2335, 2009[e].

YUAN, G.F.; YUAN, J.Q.; Li, D. Punicic Acid from *Trichosanthes kirilowii* Seed Oil Is Rapidly Metabolized to Conjugated Linoleic Acid in Rats. **Journal of Medicinal Food,** v.12, p.416-422, 2009[f].

CAPÍTULO IV

AVALIAÇÃO EM RATOS DO EFEITO DO ÓLEO DA SEMENTE DE ROMÃ (Punica granatum L.*) SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO TETRACLORETO DE CARBONO*

RESUMO

O objetivo geral deste capítulo foi avaliar o efeito da suplementação com o óleo da semente de romã (PSO) sobre marcadores de estresse oxidativo em ratos submetidos à injúria hepática induzida por tetracloreto de carbono (CCl_4). Os animais foram suplementados com PSO por via intragástrica nas concentrações de 2% e 4% em relação ao consumo diário da dieta durante 21 dias, sendo então submetidos à injúria hepática induzida pelo CCl_4. Os resultados mostraram que a suplementação com PSO reduziu as concentrações séricas enzimas aminotransferases causadas pelo CCl_4, além de reduzir a porcentagem de área lesionada no tecido hepático. Entretanto, o PSO fornece substrato para reação dos radicais livres, aumentando o nível de hidroperóxidos lipídicos no fígado. A atividade da enzima antioxidante catalase foi a mais sensível à lesão pelo CCl_4 e a suplementação com 4% de PSO manteve sua atividade à níveis normais. Entretanto, não houve diferença na expressão gênica dessa enzima. As enzimas superóxido dismutase, glutationa peroxidase e glutationa redutase não foram alteradas, mas os níveis de glutatina reduzida foram reduzidos pela suplementação com PSO em valores próximos ao controle negativo. De um modo geral, os resultados sugerem que a suplementação com PSO não é capaz de atenuar os marcadores de estresse oxidativo causado por CCl_4.

Palavras chave: ácido punícico, tecido hepático, estresse oxidativo.

1 INTRODUÇÃO

O óleo da semente de romã (PSO – *Pomegranate seed oil*) tem despertado interesse nos últimos anos devido à presença, em altas porcentagens, de um ácido graxo conjugado em sua composição: o ácido punícico (PA – *Punicic Acid*; C18:3-9*c*,11*t*,13*c*). O PA é um isômero posicional e geométrico do ácido α-linolênico que apresenta a estrutura conjugada nas suas três duplas ligações, sendo uma delas na posição *trans* (VROEGRIJK et al., 2011). Diversas pesquisas relatam que os ácidos graxos conjugados apresentam propriedades anti-carcinogênica, antioxidante e anti-inflamatória tanto *in vitro* como *in vivo*, e sua eficácia pode variar substancialmente entre os isômeros individuais (ELFALLEH et al., 2011; HENNESSY et al., 2011; BOUSSETTA et al., 2009). No capítulo II, estão apresentados os resultados que confirmam a alta porcentagem (55%) do PA no PSO e a maior estabilidade oxidativa do óleo. No capítulo III foi mostrado que a suplementação com PSO em ratos saudáveis resulta em incorporação de ácidos graxos dienos conjugados (ácido linoléico conjugado – CLA) no tecido hepático, sem alterar o nível de peroxidação lipídica e a atividade das enzimas antioxidantes.

O fígado é um importante órgão no corpo dos vertebrados e também é o maior sítio de metabolismo de xenobióticos. Algumas hepatotoxinas, incluindo o tetracloreto de carbono (CCl_4), desencadeiam injúria no fígado e são caracterizadas por diferentes graus de degeneração do hepatócito e morte celular. Autores relatam que a hepatotoxicidade pelo CCl_4 é um modelo experimental interessante, para investigar danos ao fígado induzidos pelo estresse oxidativo (JIA et al., 2011; LEE et al., 2007). O CCl_4 é metabolizado na membrana do retículo endoplasmático dos hepatócitos, pela enzima citocromo P-450 dependente de NADH, gerando radicais altamente reativos, tais como triclorometil (CCl_3•) e peroxil triclorometil (CCl_3O_2•). Ambos são capazes de se ligar as proteínas e lipídeos celulares, sendo este o passo inicial na cadeia de eventos que leva a peroxidação lipídica da membrana e finalmente a morte celular (JIA et al., 2011; HSU et al., 2009). Quando o fígado está na condição de estresse, com excesso de CCl_3•, a atividade da enzima xantina oxidase aumenta com a progressão do dano celular. Esta enzima produz ânions

superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FANG; LAI; LIN, 2008). Existem três classes de enzimas que são conhecidas por promoverem proteção contra os radicais livres: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutationa peroxidase (GPx). A SOD é uma enzima que converte a dismutação de O_2^- em H_2O_2; a CAT é uma hemoproteína que decompõe o H_2O_2 em oxigênio e água; e a GPx metaboliza o H_2O_2 e hidroperóxidos para produtos não tóxicos. Estas enzimas podem interromper a cadeia de reação da lipoperoxidação das membranas celulares e são inativadas por peróxidos lipídicos ou radicais livres, isso resulta na baixa atividade enzimática e no aumento da toxicidade pelo CCl_4 (HSU et al., 2009).

Os estudos sobre espécies reativas ao oxigênio (EROS) e o desenvolvimento de novos métodos para avaliação de atividade antioxidante têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. O efeito deletério dos EROS sobre as células e sua relação com certas doenças, agindo como causador ou agravante, impulsionou a busca por novas substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos oxidativos às células (ALVES et al., 2010). De acordo com a teoria dos radicais livres, bloquear ou retardar a reação em cadeia da oxidação é uma das estratégias praticáveis para prevenir hepatotoxicidade induzida por estresse oxidativo (LEE et al., 2007). Neste sentido, alguns trabalhos têm demonstrado que óleos ricos em ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados apresentam efeito hepatoprotetor em ratos e camundongos submetidos à injúria pelo CCl_4, por elevar os níveis das enzimas antioxidantes endógenas (SOD, CAT e GPx) e reduzir a peroxidação lipídica (JIA et al., 2011; HSU et al., 2009; FANG; LAI; LIN, 2008; MAHESWARI; RAO, 2005). Recentemente, nosso laboratório realizou um ensaio com o objetivo de verificar o efeito da suplementação com uma mistura equimolar dos isômeros de CLAs (9*c*11*t* e 10*t*12*c*) em ratos submetidos ao estresse oxidativo pelo CCl_4. Neste trabalho pode-se observar a redução do índice da peroxidação lipídica e o aumento na atividade das enzimas CAT e glutationa redutase (GR), além do aumento da glutationa reduzida (GSH) no fígado dos animais pré-tratados com CLAs (CARVALHO, 2011). Neste sentido, levando-se em consideração que o CLNA presente no PSO é incorporado no fígado de ratos na forma de CLAs (resultados apresentados no capítulo III), e

que estes apresentam melhora dos parâmetros de estresse oxidativo induzido pelo CCl_4 em ratos; buscou-se analisar se o CLA obtido através do consumo de PSO também melhora o sistema de defesa antioxidante endógeno no modelo de estresse oxidativo induzido CCl_4.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação com o óleo da semente de romã sobre marcadores de estresse oxidativo em ratos submetidos à injúria hepática induzida por tetracloreto de carbono (CCl_4).

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Investigar o efeito da suplementação com o óleo da semente de romã, rico em ácido punícico, sobre as enzimas transaminases no soro de ratos induzidos à injúria hepática por CCl_4;
- ✓ Avaliar o índice de incorporação do ácido punícico e de seus metabólitos no fígado de ratos suplementados com óleo da semente de romã e submetidos à injúria hepática por CCl_4, bem como a morfometria deste tecido;
- ✓ Analisar o efeito do óleo da semente de romã sobre a peroxidação lipídica e a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e glutationas), bem como a expressão gênica da SOD e CAT em fígado de ratos induzidos à injúria hepática por CCl_4.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

O óleo da semente de romã (PSO – *Pomegranate seed oil*) foi obtido por importação direta junto à empresa *Green Source Organics* (Boynton Beach, USA). O produto foi obtido por prensagem a frio das sementes de romã, sendo constituído principalmente de ácido α-linolênico conjugado (PA, C18:3-9*c*,11*t*,13*c*).

Para avaliar o efeito do PSO *in vivo* foram utilizados ratos (*Rattus novergicus*, var. albinus) machos da linhagem Wistar, pesando entre 120 e 150 g, provenientes do Biotério de Criação e Experimentação da FCF e Instituto de Química da USP. Foi oferecida aos animais uma dieta comercial balanceada (Nuvilab CR-1), fornecida pelo biotério e cujo laudo está apresentado em anexo (Anexo 4).

3.2 Métodos

3.2.1 Ensaio biológico

Os procedimentos descritos a seguir foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da FCF/USP, por estarem de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), conforme mostra o certificado em anexo (Anexo 7).

Foram utilizados 24 ratos, mantidos em gaiolas de plástico (três animais em cada) em uma sala com temperatura controlada e fotoperíodo (ciclo claro/escuro) de 12 horas, recebendo dieta e água *ad libitum* durante todo o período experimental. Os animais foram distribuídos, de acordo com o peso inicial (de forma que as médias de peso entre os grupos fossem a

mesma), em quatro grupos de seis animais cada: controle - (recebeu água); controle + (recebeu água e CCl_4); e dois grupos experimentais que receberam PSO (fonte de CLNA) nas concentrações de 2% e 4% em relação ao consumo diário de dieta e CCl_4. Após um período de aclimatação de sete dias, os animais começaram a receber a suplementação, por via intragástrica utilizando seringas descartáveis de três mL e agulha de gavagem.

O experimento teve duração de 21 dias e nos 19º e 21º dias, os animais foram submetidos à injúria hepática aguda induzida por CCl_4 na dose de dois mL por kg de peso da mistura CCl_4 : azeite de oliva (diluição 1:1), via intraperitonial. Os animais do grupo controle - (saudável), receberam uma injeção contendo apenas o veículo (azeite de oliva). No 22º dia, após jejum de oito horas, os animais foram anestesiados com injeção intraperitonial de uma mistura de cetamina (90 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), dose recomendada pelo Biotério de Criação e Experimentação, e eutanasiados. Amostras de sangue foram coletadas pela artéria aorta abdominal e centrifugadas a 3.500 rpm por 15 minutos a 4ºC, o soro obtido foi armazenado a –80ºC até o momento das análises. O tecido hepático também foi coletado, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenados a –80ºC até o momento das análises.

3.2.2 Transaminases no soro

A análise das enzimas marcadoras de dano hepático, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), foram avaliadas por meio de *Kits* laboratoriais (Labtest®, Lagoa Santa, Brasil). As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em unidades (U) por dL.

3.2.3 Perfil de ácidos graxos no tecido hepático

Os lipídeos do tecido hepático foram extraídos segundo o método descrito por Folch, Lee e Stanley (1957), os ácidos graxos foram transformados em ésteres metílicos de acordo com o método de esterificação alcalina

[utilizando $NaOCH_3$ em metanol] proposto por Christie, Sédédio e Juanéda (2001) e foram então injetados no cromatógrafo gasoso [CG - marca Shimadzu, modelo 2010, com detector de ionização de chama e coluna de sílica fundida (100m e 0,25mm de diâmetro interno / SP-2560)] seguindo a programação descrita por Baublits et al. (2007). Essas metodologias estão detalhadas nos capítulos II e III.

3.2.4 Morfometria do tecido hepático

Um pequeno fragmento do tecido hepático dos animais foi coletado e imediatamente fixado em formalina (4%). Seções de (5 µm) foram preparadas e coradas com hematoxilina-eosina (HE) para observações fotomicroscópicas.

As lesões observadas no parênquima hepático foram analisadas pela determinação da porcentagem média de área lesada. Inicialmente foram obtidas por lâmina, cinco imagens de mesma dimensão, representativas de toda a amostra. A obtenção das imagens foi realizada em aumento de 40 vezes (objetiva de 4x), pela câmera Cool SNAP-Pro*cf (Media Cybernetics Inc)* acoplada a microscópio Nikon Eclipse-E800. Em seguida, os limites das lesões foram definidos manualmente, as áreas lesadas foram somadas por lâmina e a porcentagem média foi calculada, sendo então obtida a porcentagem média por grupo. As medidas foram realizadas com auxílio do sistema computadorizado de imagens Image-Pro Plus, versão 4.5 *(Media Cybernetics Inc)*. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão.

3.2.5 Homogeneizado do tecido hepático e quantificação das proteínas

O tecido hepático dos animais foi pesado e homogeneizado, em homogeneizador tipo ultra-turrax (modelo T10 basic, marca IKA), com um volume de tampão fosfato de potássio 0,1 M e pH 7,0 igual a três vezes o valor absoluto da massa da amostra pesada. Os homogeneizados foram centrifugados a 15.000 rpm por 30 minutos à temperatura de 4ºC e o

sobrenadante foi empregado na avaliação da lipoperoxidação e atividade das enzimas antioxidantes.

A determinação do conteúdo de proteínas presente nos homogeneizados dos tecidos foi realizada em triplicata, segundo o método de Bradford (1985), obtendo-se as leituras no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro (SPECTRONIC® 20 GENESYS™, Rochester, USA). A quantidade de proteína das amostras foi calculada a partir da curva padrão utilizando albumina de soro bovino (Sigma A4503).

3.2.6 Peroxidação lipídica e atividade das enzimas antioxidantes

A determinação da peroxidação lipídica nos homogeneizados de fígado foi realizada através da medida de produção das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizando-se o método descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979) com pequenas adaptações, conforme descrito no capítulo III.

O conteúdo de glutationa reduzida (GSH) nos homogeneizados de fígado foi realizado segundo protocolo descrito por Tietze (1969) que se fundamenta na reação da GSH presente nos homogenatos com a substância 5,5´ditiobis-2,2 ácido nitrobenzóico (DTNB) para produzir um composto colorido que absorve espectrofotometricamente a 412 nm. Os homogeneizados foram ressuspensos numa solução de EDTA (10^{-3} M) em ácido tricloroacético 5%, centrifugado a 17000 rpm por 15 minutos a 4ºC e o sobrenadante coletado. Posteriormente, foi colocado em um tubo de ensaio 1375 µL de tampão fosfato pH 8,0 e 100 µL do sobrenadante contendo GSH. Em seguida, adicionou-se 25 µL de DTNB (10 mM) dissolvido em acetona, agitou-se e a absorbância foi medida a 412 nm em espectrofotômetro (SPECTRONIC® 20 GENESYS™, Rochester, USA). A concentração de GSH foi quantificada utilizando uma curva padrão de GSH (50 – 800 µM / Sigma G4251).

A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx) foram avaliadas de acordo com as metodologias descritas por McCord e Fridovich (1969), Beutler (1975) e Sies (1979), respectivamente; já descritas anteriormente (capítulo III). A atividade da

enzima glutationa redutase (GR) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Sies (1979). Este método fundamenta-se na medição do decaimento da absorbância a 340 nm, promovido pela oxidação do NADPH a 30ºC (coeficiente de extinção molar igual a 6,22 $nM^{-1}.cm^{-1}$) durante a redução da glutationa oxidada (GSSG) catalisada pela GR. O meio de reação contém GSSG 50 mM, NADPH (4 mM em NaOH 0,02 M), EDTA 5 mM / pH 7,0 e tampão fosfato de potássio 0,1 M / pH 7,0. Foi tomado 950 µL deste meio e acrescentou-se 50 µL de cada amostra (em duplicata). A solução foi incubada a 30°C e as leituras realizadas a cada minuto num período de seis minutos. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade (U) da enzima foi definida como atividade da enzima que oxida 1 µMol de NADPH por minuto.

3.2.7 Expressão gênica da SOD e CAT no tecido hepático

A análise de expressão gência das enzimas SOD e CAT foi realizada no Laboratório de Virologia do Instituto Butantã, através da técnica de RT-PCR (*reverse-transcriptase polymerase chain reaction*) conforme descrita por Mancini-Filho et al. (2009). Inicialmente, o RNA total do tecido hepático foi obtido utilizando o reagente Trizol. Em seguida, foi realizada a fase de transcrição reversa do RNA utilizando os reagentes da Promega, conforme recomendação do fabricante. O produto (cDNA) foi então amplificado em termociclador. A SOD foi amplificada a 94ºC por 45 s, 56ºC por 30 s e 72ºC por 45 s, num total de 23 ciclos seguido por um tempo de 10 minutos de extensão a 72ºC. A CAT foi amplificada a 94ºC por 30 s, 58ºC por 30 s, e 72ºC por 1 minuto num total de 30 ciclos por um tempo de 10 min de extensão a 72ºC. Os produtos amplificados foram determinados por eletroforese num gel de agarose (2%) contendo 0,06 mg/L de brometo de etídio. O gel foi fotografado sobre transiluminação ultravioleta e quantificado utilizando o *sofwere Quantity One* (versão 4.6.3 / Bio-Rad), sendo os resultados expressos como unidades arbitrárias.

Primer SOD – sequencia (5’-3’): TCT AAG AAA CAT GGC GGT CC
Primer SOD – sequencia (3’-5’): CAG TTA GCA GGC CAGCAG AT

Primer CAT – sequencia (5'-3'): GCG AAT GGA GAG GCA GTG TAC
Primer CAT – sequencia (3'-5'): GAG TGA CGT TGT CTT CAT TAG CAC TG

3.2.8 Análise estatística

Foram realizadas análises de Estatística Univariada e Multivariada, com aplicação da Análise por Componentes Principais (ACP), conforme descritas no capítulo III. Valores de probabilidade (p-valor) abaixo de 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Transaminases no soro

O efeito do pré tratamento com o PSO na concentração das enzimas AST e ALT no soro induzidas pelo CCl_4 estão apresentadas na Figura IV.1. Foi confirmado o aumento destas enzimas no soro dos animais tratado com CCl_4 em relação ao controle saudável e o tratamento com PSO reduziu significativamente as concentrações de AST e ALT quando comparado ao controle +.

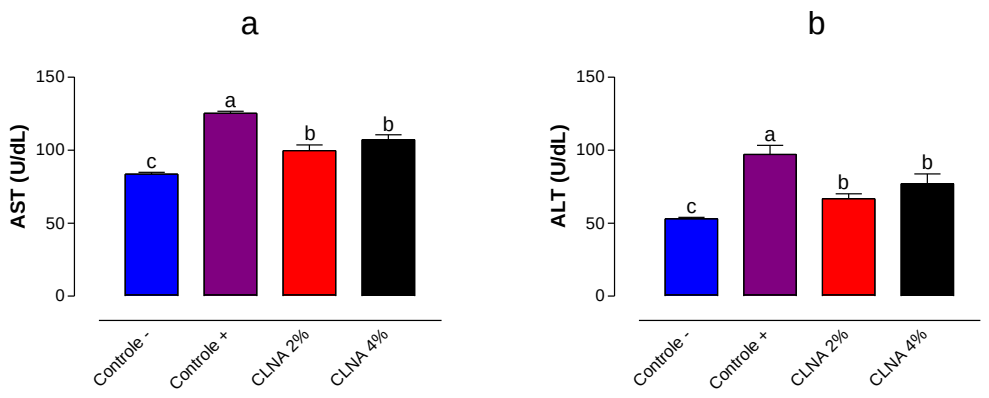


Figura IV.1. Transaminases: (a) alanina aminotransferase – AST ($p<0,01$) e (b) aspartato aminotransferase – ALT ($p<0,01$), em ratos suplementados com óleo da semente de romã (grupo CLNA) durante 21 dias e submetidos à injúria hepática com CCl_4.

A relação AST/ALT não diferiu entre os grupos (Controle -: 1,58; Controle +: 1,29; CLNA 2%: 1,49; CLNA 4%: 1,39), indicando que o dano hepatocelular pode ser considerado leve.

Segundo Lee et al. (2007), é bem conhecido que agentes químicos que produzem injúria hepática causam aumento das enzimas AST e ALT no soro, e isto pode indicar o índice de injúria no fígado. Neste sentido, comparado a outros estudos que utilizaram CCl_4 e apresentaram níveis muito elevados de AST e ALT nos grupos tratados com CCl_4 em relação ao controle saudável (HSU et al., 2009; FANG; LIN, 2008; LEE et al., 2007), os valores aqui apresentados estão mais baixos podendo indicar um dano leve ao fígado. Ainda assim, pode ser observado que o tratamento com PSO atenua a elevação das enzimas AST e ALT pelo CCl_4.

4.2 Lipídeos totais e perfil de ácidos graxos no tecido hepático

O conteúdo de lipídeos totais e o perfil de ácidos graxos do tecido hepático dos animais suplementados com PSO e submetidos à injúria hepática com CCl_4 confirmam os resultados encontrados no capítulo anterior (III), uma vez que os animais suplementados com a dose de 4% apresentaram maior

conteúdo de lipídeos no fígado (Figura IV.2) e o perfil de ácidos graxos confirmou a metabolização e incorporação tecidual de CLAs de maneira dose resposta (Tabela IV.1).

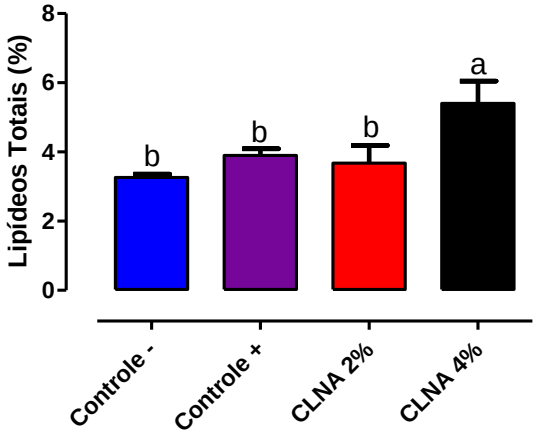


Figura IV.2. Conteúdo de lipídeos totais em fígado de ratos suplementados com óleo da semente de romã (grupo CLNA) durante 21 dias e submetidos à injúria hepática com CCl_4 (p=0,02).

Tabela IV.1. Perfil de ácidos graxos (AGs) no tecido hepático de ratos suplementados com óleo da semente de romã (grupo CLNA) durante 21 dias e submetidos à injúria hepática com CCl_4.

AGs	Controle -	Controle +	CLNA 2%	CLNA 4%	P-valor
C 16:0	17,11 ± 0,17[b]	21,10 ± 1,20[a]	19,93 ± 1,69[a]	20,14 ± 1,53[a]	<0,01
C 18:0	19,53 ± 0,89[a]	12,78 ± 1,45[c]	15,67 ± 3,21[b]	13,78 ± 2,53[bc]	<0,01
C 18:1*c* ω-9	6,11 ± 1,70[c]	14,00 ± 3,47[a]	10,81 ± 3,34[b]	11,66 ± 2,79[ab]	<0,01
C 18:1*c* ω-7	2,50 ± 0,33	2,36 ± 0,26			0,86
C 18:2*c* ω-6	20,10 ± 0,41[c]	26,67 ± 2,82[a]	23,41 ± 2,57[b]	23,38 ± 1,88[b]	<0,01
C 18:3*c* ω-3	0,73 ± 0,23	0,85 ± 0,36	0,70 ± 0,17	0,64 ± 0,16	0,54
CLA 9*c*11*t*			2,97 ± 0,72[b]	6,35 ± 1,13[a]	<0,01
CLA 10*c*12*c*			1,03 ± 0,43	1,59 ± 0,53	0,07
C 20:4 ω-6	28,28 ± 1,42[a]	16,99 ± 1,59[b]	19,89 ± 3,20[b]	17,36 ± 2,91[b]	<0,01
C 18:3 9*c*11*t*13*c*			0,39 ± 0,07[b]	0,66 ± 0,24[a]	<0,01
C 22:6 ω-3	5,65 ± 0,49	5,24 ± 1,08	5,19 ± 1,14	4,46 ± 1,15	0,30

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=6). Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si, p<0,05.

4.3 Morfometria do tecido hepático

A análise microscópica mostrou que o tecido hepático no grupo controle negativo estava preservado, com hepatócitos em disposição radial, núcleos e citoplasma preservados. Entretanto, os grupos tratados com CCl_4 exibiram alterações morfológicas evidentes. No grupo controle positivo observou-se degeneração vacuolar micro e macrogoticular moderada a acentuada difusa, sendo mais proeminente ao redor de veia centro lobular, e extensas áreas de necrose de coagulação associadas a moderado infiltrado neutrofílico, debris celulares e focos de hemorragia (Figura IV.3). Já os grupos tratados com PSO, a degeneração vacuolar micro e macrogoticular foi de discreta a moderada difusa, sendo mais proeminente ao redor de veia centro lobular e áreas de necrose de coagulação localizadas principalmente na

superfície do órgão associadas a discreto infiltrado neutrofílico, debris celulares e focos de hemorragia. As lesões observadas no parênquima hepático foram analisadas pela determinação da porcentagem média de área lesada, com o intuito de quantificar as diferenças observadas entre os grupos controle positivo e aqueles suplementados com PSO (grupo CLNA) (Figura IV.4).

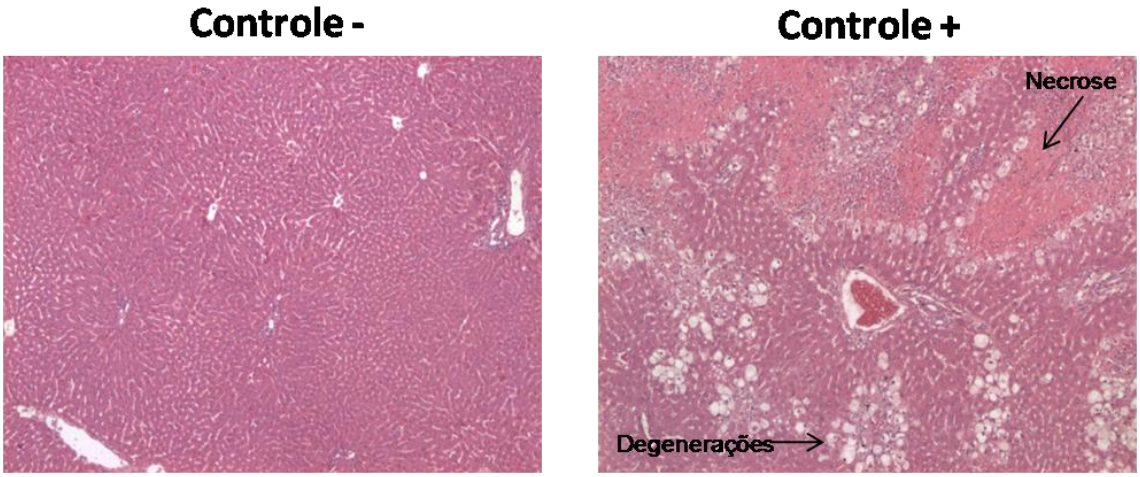


Figura IV.3. Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado não tratado (Controle -) e tratado (Controle +) com CCl_4, mostrando as áreas de degeneração e necrose. Coloração: HE; aumento: 4x.

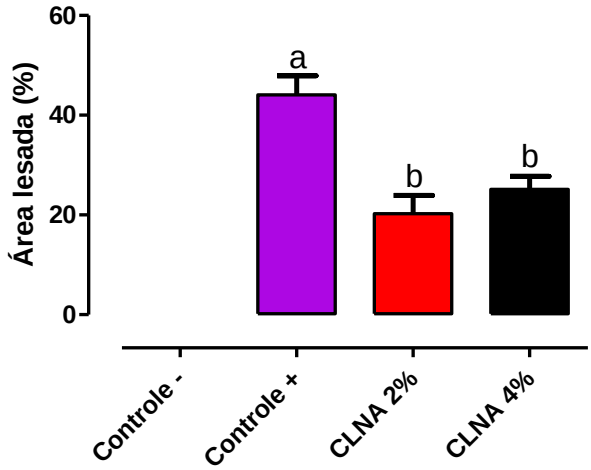


Figura IV.4. Valores referentes a porcentagem de área lesada do fígado de ratos suplementados com óleo da semente de romã (grupo CLNA) durante 21 dias e submetidos à injúria hepática com CCl_4 ($p<0,01$).

De acordo com a Figura IV.4, podemos observar que a suplementação com PSO (rico em ácido punícico) protegeu o parênquima hepático dos animais contra a ação do CCl_4, sugerindo que os CLAs incorporados neste tecido tem efeito protetor sobre os hepatócitos contra os danos causados pelo radical. As fotomicrografias representando as áreas de lesões por grupo podem ser observadas na Figura IV.5.

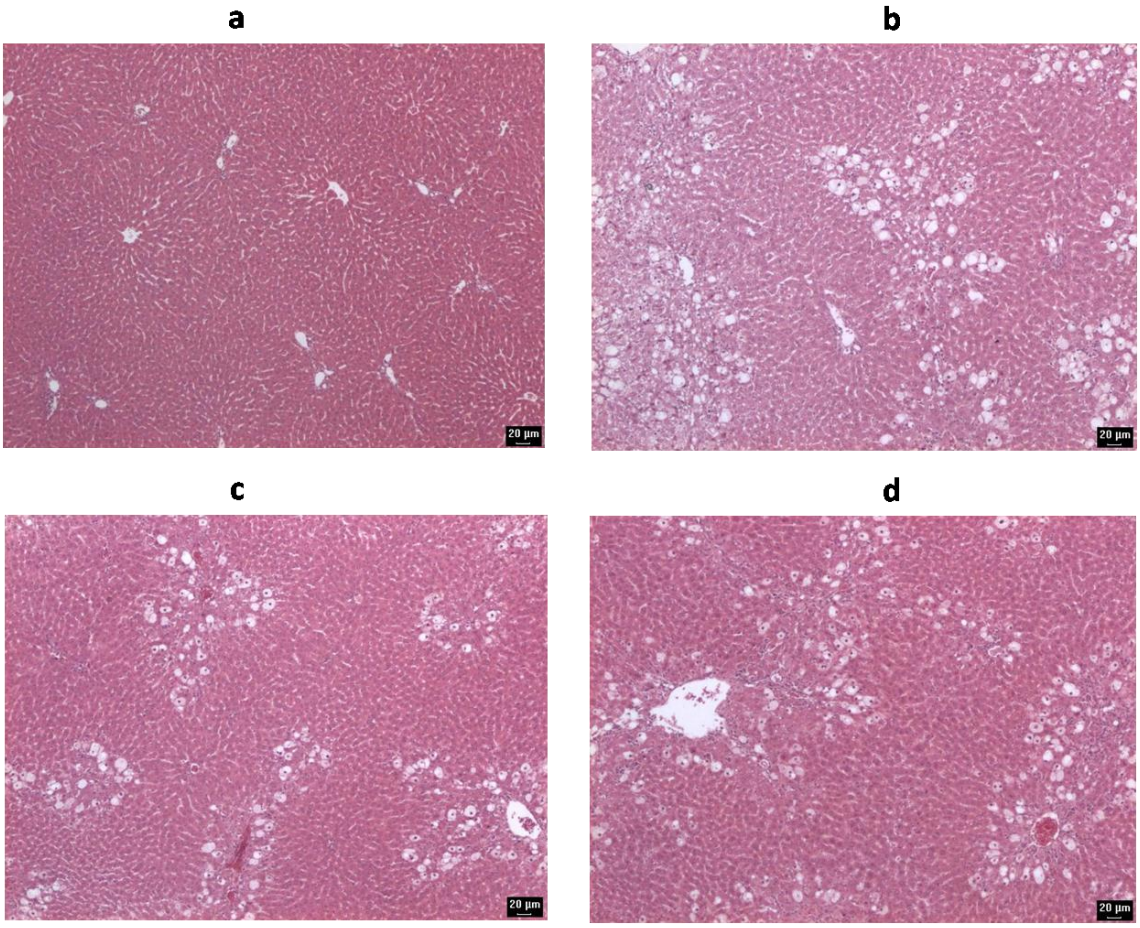


Figura IV.5. Fotomicrografias de cortes histológicos de fígado mostrando áreas de lesão. (a) grupo controle -, (b) grupo controle +, (c) grupo CLNA 2% e (d) grupo CLNA 4%. Coloração: HE; aumento: 4x; escala: 20µm.

4.4 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é considerada um marcador de dano oxidativo (LEE et al., 2007). De acordo com a Figura IV.6, pode-se observar que a metodologia de indução da injúria hepática utilizada não provocou dano severo ao fígado, pois não foram observadas diferenças significativas nos valores de TBARS do soro entre os grupos saudáveis e submetidos a injúria hepática. Entretanto, a Figura IV.6(b) mostra que houve aumento significativo nos valores de TBARS do tecido hepático entre os grupos controle. Com relação aos grupos tratados com PSO, os valores de TBARS aumentaram significativamente em relação aos dois controles (saudável e tratado com CCl_4).

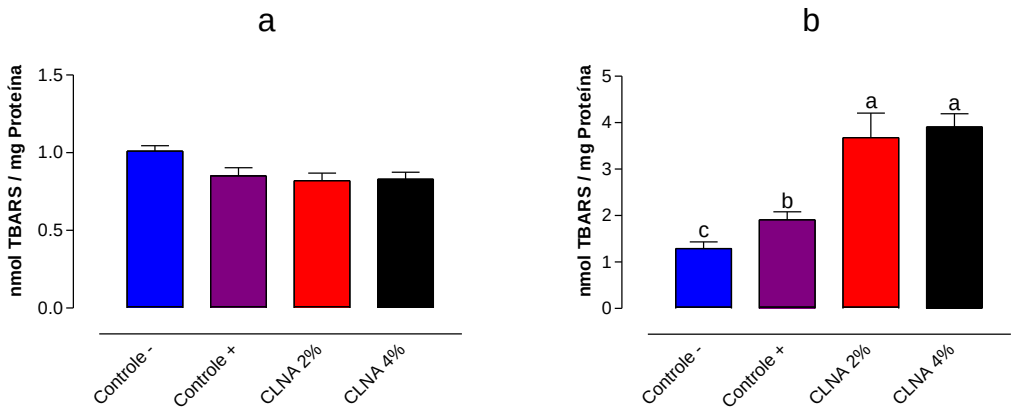


Figura IV.6. Efeito sobre a peroxidação lipídica, através da medida de TBARS: (a) soro (p=0,05) e (b) fígado (p<0,01), de ratos suplementados com óleo da semente de romã (grupo CLNA) durante 21 dias e submetidos à injúria hepática com CCl_4.

Alguns autores têm relatado que óleos ricos em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) melhoram os níveis de TBARS de animais submetidos à injúria com CCl_4 (JIA et al., 2011; HSU et al., 2009; MAHESWARI; RAO, 2005). Entretanto, a peroxidação lipídica é um tipo particular de reação de oxidação resultante do ataque por radicais livres reativos nas cadeias laterais

dos PUFAs dos fosfolipídeos das membranas (FANG; LIN, 2008). Neste sentido, Fang e Lin (2008) ao suplementar ratos com óleo de milho e induzi-los a injúria com CCl_4, observaram que o óleo de milho rico em PUFAs aumentou marcadamente os produtos da lipoperoxidação hepáticos induzidos por CCl_4 e, portanto, não melhora o quadro de fibrose hepática. Os resultados aqui apresentados sugerem que tanto os ácidos graxos trieno conjugados presentes no PSO, como os ácidos graxos dienos conjugados obtidos a partir de sua metabolização, são mais susceptíveis ao ataque dos radicais livres produzidos pelo CCl_4, elevando os níveis de TBARS no fígado dos animais tratados com PSO, conforme observado na Figura IV.6(b). Kim et al. (2005) analisaram os efeitos da suplementação dos conjugados do ácido linoléico na peroxidação lipídica em fígado de ratos e seus resultados indicaram também que os níveis de TBARS hepáticos foram significativamente mais elevados nos grupos alimentados com CLAs do que no grupo controle. O TBARS é um produto secundário da peroxidação lipídica, concluindo-se que o tratamento adicional de CLAs pode provocar a peroxidação lipídica e em doses elevadas podem causar problemas como danos no fígado.

4.5 Atividade e expressão gênica das enzimas antioxidantes

Na Figura IV.7 estão apresentadas as atividades das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GR) e GSH no fígados dos animais.

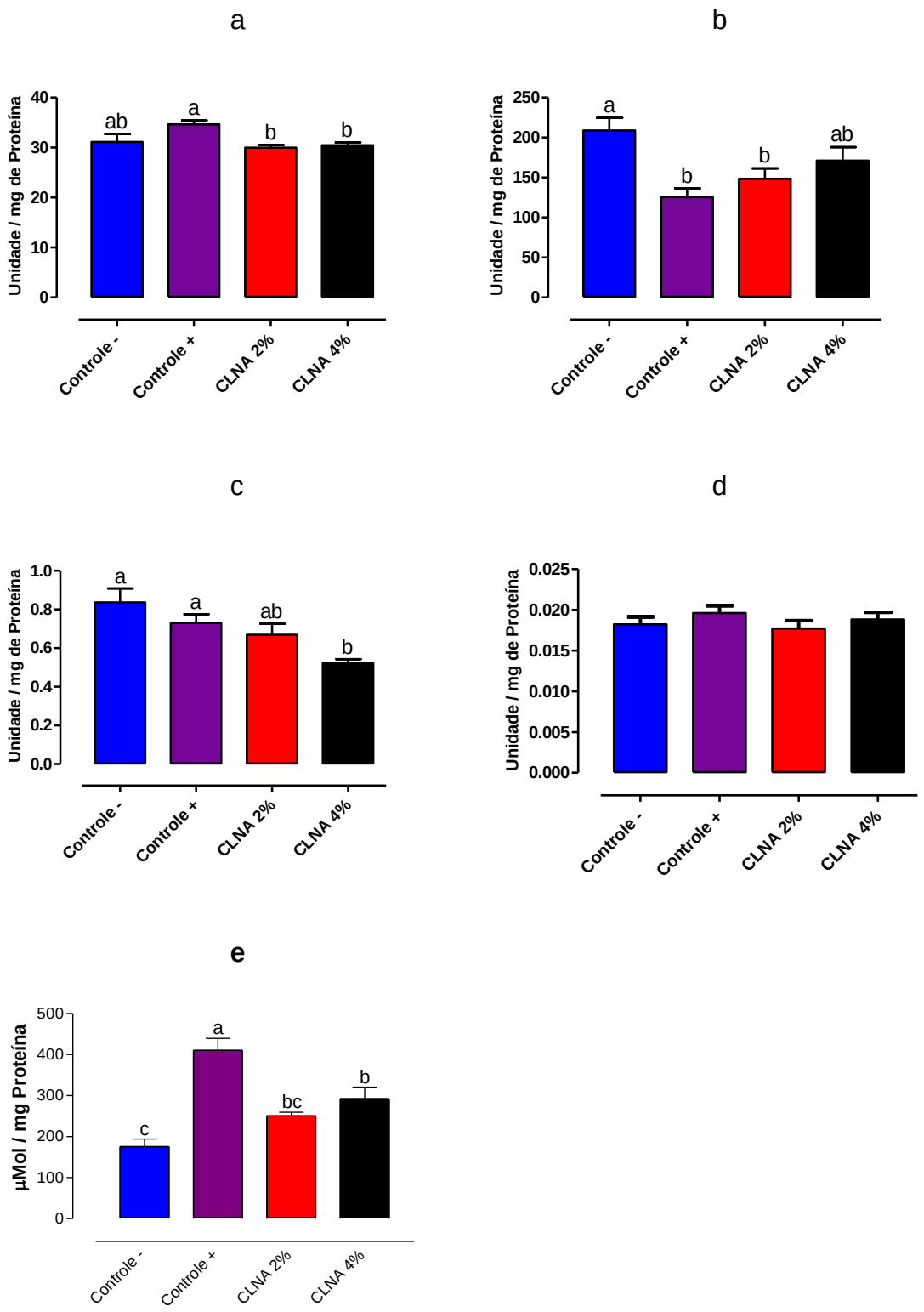


Figura IV.7. Atividade das enzimas antioxidantes: (a) superóxido dismutase (p=0,02), (b) catalase (p=0,01), (c) glutationa peroxidase (p<0,01), (d) glutationa redutase (p=0,52) e (e) glutationa reduzida (p<0,01), em fígado de ratos suplementados com óleo da semente de romã (grupo CLNA) durante 21 dias e submetidos à injúria hepática com CCl_4.

De acordo com a Figura IV.7, pode-se observar que houve uma redução significativa da enzima CAT do grupo controle induzido com CCl_4 (+) em comparação ao controle saudável (-) e que a suplementação com PSO na dose de 4% manteve a atividade dessa enzima a valores próximos da atividade do grupo controle -. Em contrapartida, não foram observadas diferenças na atividade da SOD e glutationas (GPx e GR) entre os grupos controles, indicando mais uma vez que o método de indução da injúria hepática com CCl_4 não foi suficiente para causar um dano grave ao tecido a ponto de alterar a atividade dessas enzimas. No entanto, foi observada redução na atividade da GPx no grupo suplementado com 4% de PSO, sugerindo que esta enzima está sendo inativada pelos peróxidos lipídicos decorrentes da lipoperoxidação. Os mesmos resultados foram observados em nosso laboratório em animais suplementados com CLAs e induzidos a injúria por CCl_4 (CARVALHO, 2011). Com relação aos níveis de GSH, pode-se observar que o grupo controle + aumentou significativamente, enquanto a suplementação com PSO reduziu os valores semelhates ao controle negativo. A redução nos valores de GSH pode está relacionada ao aumento de TBARS nos grupos tratados com PSO, resultando em maior consumo de GSH.

Estudos sobre os efeitos dos CLNAs em organismos animais submetidos à estresse oxidativo são escassos. Sara e Ghosh (2009) analisaram a influência de dois isômeros de CLNA (0,5% dos lipídios totais ofertado durante 15 dias) contra o estresse oxidativo induzido pelo arsenito sódio. Arsenitos são conhecidos como geradores de estresse oxidativo por aumentar as espécies reativas ao oxigênio. Os resultados mostraram que o arsenito de sódio alterou a atividade das enzimas antioxidantes no plasma e nos homogeneizados de fígado e cérebro. Enquanto o α-ESA (ácido eleosteárico, 18:3-9*c*11*t*13*t*) e o PA aumentaram a atividade da SOD, CAT e GPx e reduziram a atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) para os valores normais. Algumas diferenças na efetividade dos dois isômeros foram observadas, o que é devido ao seu arranjo molecular com ligações *cis-trans* antagônicas. Neste estudo, o α-ESA foi mais eficiente como antioxidante que o PA, devido ao seu maior conteúdo de *trans*. Recentemente, esses autores mostraram os mesmos resultados utilizando duas doses de CLNAs (0,5% e 1%

dos lipídios totais ofertados durante 21 dias). No entanto, não foi observado efeito dose resposta (SAHA; GHOSH, 2011). Estes autores analisaram ainda o efeito dos CLNAs no quadro de estresse oxidativo, reduzindo a peroxidação lipídica e restaurando a atividade das enzimas antioxidantes no soro e no pâncreas de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (SAHA; GHOSH, 2012).

Os resultados de expressão gênica das enzimas SOD e CAT mostram que não existiram alterações da suplementação quando comparados aos controles (Figura IV.8).

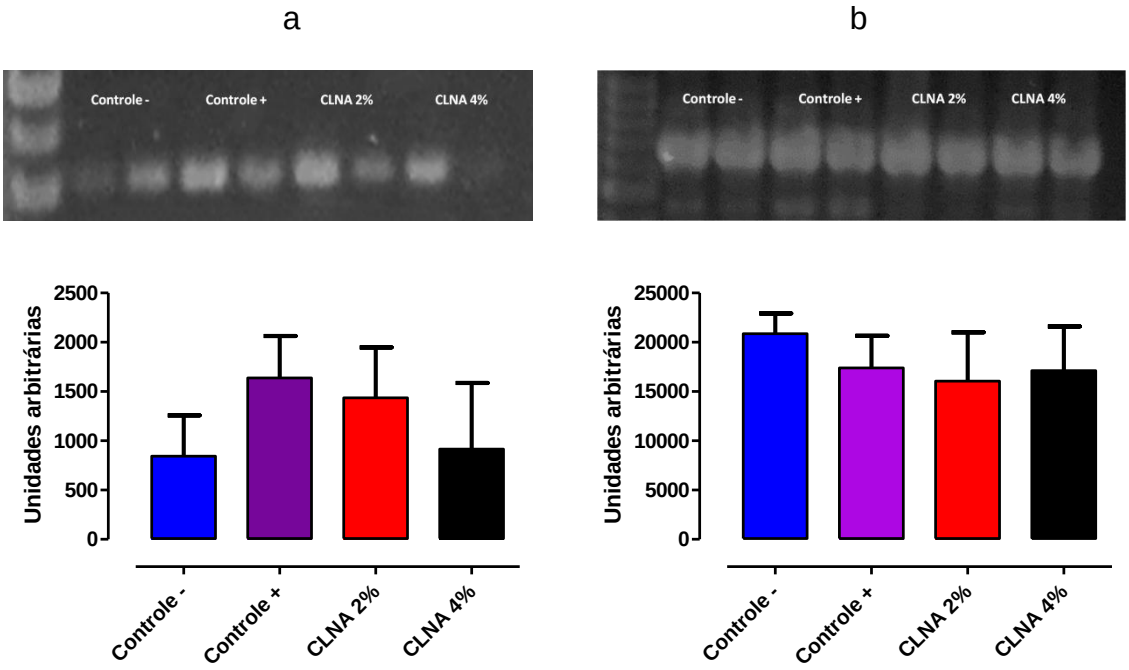


Figura IV.8. Expressão gênica das enzimas antioxidantes: (a) SOD e (b) CAT em fígado de ratos suplementados com óleo da semente de romã (grupo CLNA) durante 21 dias e submetidos à injúria hepática com CCl_4.

4.6 Análise de estatística multivariada

Com o intuito de verificar associações entre os resultados obtidos neste capítulo, foi aplicada a ACP aos dados previamente auto-escalados, conforme mostra a Figura IV.9.

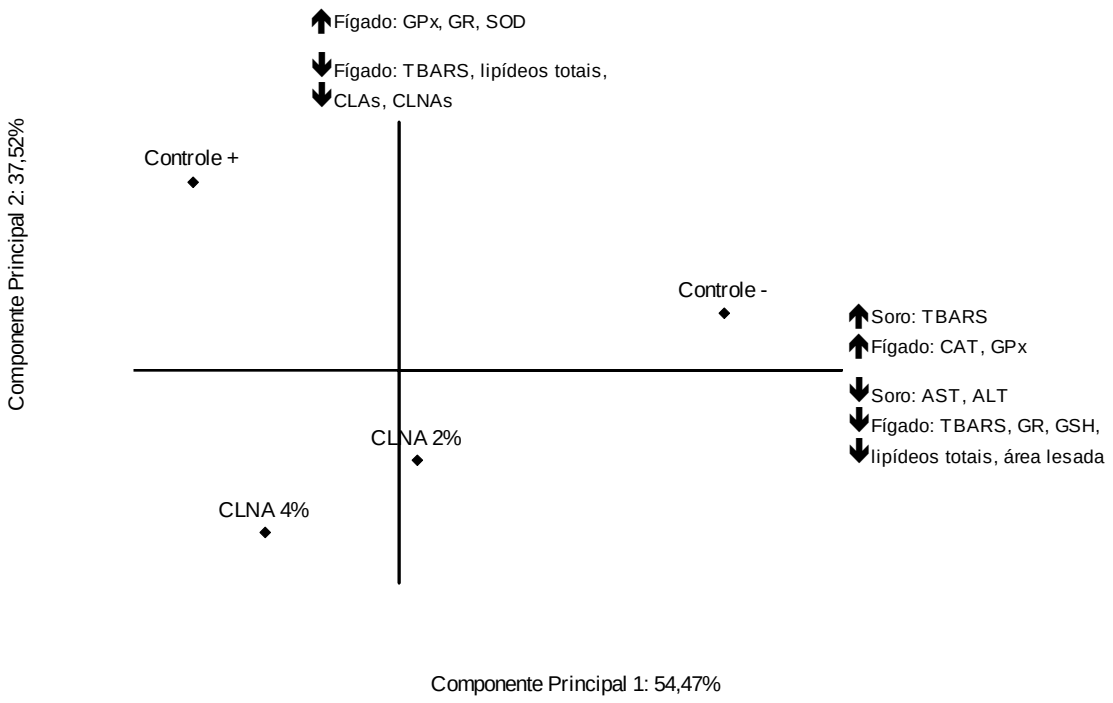


Figura IV.9. Análise por Componentes Principais (PC1 x PC2) para mostrar diferenças nos parâmetros avaliados entre os grupos controles e suplementados com o óleo da semente de romã (grupo CLNA).

De acordo com a Figura (IV.9) podemos observar que os grupos estão dispostos separadamente nos quadrantes, com uma variância cumulativa de 91,99%; enfatizando a formação de grupos com características semelhantes, de acordo com variáveis de resposta selecionadas. A suplementação com PSO está envolvida com o aumento de lipídeos totais e de TBARS no fígado, bem como associada a redução na atividade das enzimas SOD, GPx e GR, indicando que este óleo não possui efeito sobre os marcadores de estresse oxidativo neste modelo experimental.

5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, conclui-se que a suplementação com PSO tende a reduzir as concentrações séricas das enzimas aminotransferases causadas pelo CCl_4, além de reduzir a porcentagem de área lesionada no tecido hepático. Entretanto, este óleo fornece substrato para o ataque dos radicais livres, aumentando o nível de hidroperóxidos lipídicos no fígado. A atividade da enzima antioxidante catalase foi a mais sensível ao ataque pelo CCl_4 e a suplementação com PSO na dose de 4% aumenta sua atividade à níveis normais. Entretanto, esse efeito não está relacionado com a expressão gênica dessa enzima no tecido hepático. As enzimas SOD, GPx e GR não foram alteradas, mas os níveis de GSH foram reduzidos pela suplementação com PSO a níveis próximos ao controle negativo. De modo geral, os resultados sugerem que a suplementação com PSO não foi capaz de atenuar os marcadores de estresse oxidativo causado pelo CCl_4.

6 REFERÊNCIAS

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova,** v.33, p.2202-2210, 2010.

BAUBLITS, R.T.; POHLMAN, F.W.; BROWN JR., A.H.; JOHNSON, Z.B.; PROCTOR, A.; SAWYER, J.; DIAS-MORSE, P.; GALLOWAY, D.L. Injection of conjugated linoleic acid into beef strip loins. **Meat Science**, v.75, p.84–93, 2007.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism**: a manual of biochemical methods. 2.ed. New York, London: Grune & Stratton, 1975. p.89-90.

BOUSSETTA, T.; RAAD, H.; LETTÈRON, P.; GOUGEROT-POCIDALO, M.A.; MARIE, J.C.; DRISS, F.; EL-BENNA, J. Punicic acid a conjugated linolenic acid inhibits TNFα-induced neutriphil hyperactivation and protects from experimental colon inflammation in rats. **PLoS ONE**, v.4, p.e6458-6469, 2009.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.677-685, 1985.

CARVALHO, E.B.T. **Efeitos dos isômeros conjugados do ácido linoléico sobre a peroxidação lipídica em ratos**. 2011, 128p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CHRISTIE, W.W.; SÉBÉDIO, J.L.; JUANÉDA, P. A practical guide to the analysis of conjugated linoleic acid (CLA). **Inform**, v.12, p.147-152, 2001.

ELFALLEH, W.; YING, M.; NASRI, N.; SHENG-HUA, H.; GUASMI, F.; FERCHICHI, A. Fatty acids from Tunisian and Chinese pomegranate (*Punica grantum* L.) seeds. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.62, p.200-206, 2011.

FANG, H.L.; LIN, W.C. Corn oil enhancing hepatic lipid peroxidation induced by CCl_4 does not aggravate liver fibrosis in rats. **Food and Chemical Toxicology,** v.46, p.2267-2273, 2008.

FANG, H.L.; LAI, J.T.; LIN, W.C. Inhibitory effect of olive oil on fibrosis induced by carbon tetrachloride in rat liver. **Clinical Nutrition**, v.27, p.900-907, 2008.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids. **The Journal of Biological Chemistry**, v.226, p.497-509, 1957.

HENNESSY, A.A.; ROSS, R.P.; DEVERY, R.; STANTON, C. The health promoting properties of the conjugated isomers of α-linolenic acid. **Lipids**, v.40, p.105-119, 2011.

HSU, Y.W.; TSAI, C.F.; CHEN, W.K.; LU, F.J. Protective effects of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.2281-2288, 2009.

JIA, X.Y.; ZHANG, Q.A.; ZHANG, Z.Q.; WANG, Y.; YUAN, J.F.; WANG, H.Y.; ZHAO, D. Hepatoprotective effects of almond oil against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. **Food Chemistry**, v.125, p.673-678, 2011.

KIM, H.K.; KIM, S.R.; AHN, J.; CHO, H.J.; YOON, C.S.; HA, T.Y. Dietary conjugated linoleic acid reduces lipid peroxidation by increasing oxidative stability in rats. **Journal of Nutritional Science Vitaminology**, v.51, p.8-15, 2005.

LEE, C.P.; SHIH, P.H.; HSU, C.L.; YEN, G.C. Hepatoprotection of tea seed oil (*Camellia oleifera* Abel.) against CCl_4-induced oxidative damage in rats. **Food and Chemical Toxicology,** v.45, p.888-895, 2007.

MAHESWARI, M.U.; RAO, P.G.M. Antihepatotoxic effect of grape seed oil in rat. **Indian Journal of Pharmacology**, v.37, p.179-182, 2005.

MANCINI-FILHO, J.; NOVOA, A.V.; GONZÁLEZ, A.E.B.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; PINTO, J.R.; MANCINI, D.A.P. Free phenolic acids from the seaweed Halimeda monile with antioxidant effect protecting against liver injury. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v.64, p.657-663, 2009.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase, an enzyme function for erythrhrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v.244, p.6049-6055, 1969.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v.95, p.351–358, 1979.

SAHA, S.S.; GHOSH, M. Antioxidant and anti-inflammatory effect of conjugated linolenic acid isomers against streptozotocin-induced diabetes. **British Journal of Nutrition**, v.108, p.974-983, 2012.

SAHA, S.S.; GHOSH, M. Antioxidant effect of vegetable oils containing conjugated linolenic acids isomers against induced tissue lipid peroxidation and inflammation in rat model. **Chemico-Biological interactions,** v.190, p.109-120, 2011.

SAHA, S.S.; GHOSH, M. Comparative study of antioxidant activity of α-eleostearic acid and punicic acid against oxidative stress generated by sodium arsenite. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.2551-2556, 2009.

SIES, H.; KOCH, O. R.; MARTINO E.; BOVERIS A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Letters**, v.103, p.287-290, 1979.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v.27, p.502-22, 1969.

VROEGRIJK, I.O.; VAN DIEPEN, J.A.; VAN DEN BERG S.; WESTBROEK, I.; KEIZER, H.; GAMBELLI, L.; HONTECILLAS, R.; BASSAGANYA-RIERA, J.; ZONDAG, G.C.; ROMIJN, J.A.; HAVEKES, L.M.; VOSHOL, P.J. Pomegranate seed oil, a rich source of punicic acid, prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.1426-1430, 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desde a sua descoberta, aos ácidos graxos conjugados (CLAs e CLNAs) têm sido atribuídas propriedades redutoras do tecido adiposo, indutoras do tecido muscular e ainda como inibidores da carcinogênese. Os CLAs vêm sendo exaustivamente investigados com relação aos seus efeitos benéficos ao organismo. Estes estudos estão focados principalmente na sua atividade antiadipogênica. Entretanto, os resultados inconclusivos e controversos, algumas vezes mostrando efeitos adversos, demonstram a falta de segurança com relação ao seu uso. Isto levou a ANVISA a proibir sua comercialização no Brasil. Outro tipo de conjugados, os CLNAs, também vem chamando a atenção mais recentemente e tem sido alvo de pesquisas que avaliam os seus efeitos no organismo. Por eles serem metabolizados a CLAs em vários modelos animais, os trabalhos são direcionados para a obtenção de resultados semelhantes ao CLAs.

Nesta linha, foi investigado o óleo da semente de romã, conhecido por sua alta concentração de ácido punícico (CLNA). O capítulo I mostra que a literatura aponta muito efeitos benéficos à saúde, porém os trabalhos são mais escassos que aqueles com CLAs, e mostram resultados inconsistentes, não permitindo a obtenção de conclusões sobre os seus potenciais efeitos. No capítulo II, pode-se confirmar a alta porcentagem (55%) de ácido punícico no PSO, bem como concentrações elevadas de vitamina E e fitosteróis, além de estar dentro dos padrões de qualidade e estabilidade. No capítulo III, a suplementação de ratos com PSO confirmam a metabolização e incorporação de CLAs nos tecidos dos animais que receberam o óleo rico em ácido punícico. Esta incorporação mostrou-se de maneira diferente nos diversos tecidos estudados, mas não foram observados os mesmos efeitos que na literatura são atribuídos aos CLAs, como a redução na gordura corporal e aumento da massa magra. Além disso, não foram encontradas diferenças na lipoperoxidação nos tecidos e na atividade das enzimas antioxidantes. No capítulo IV, apresentamos os resultados de experimento com animais submetidos a

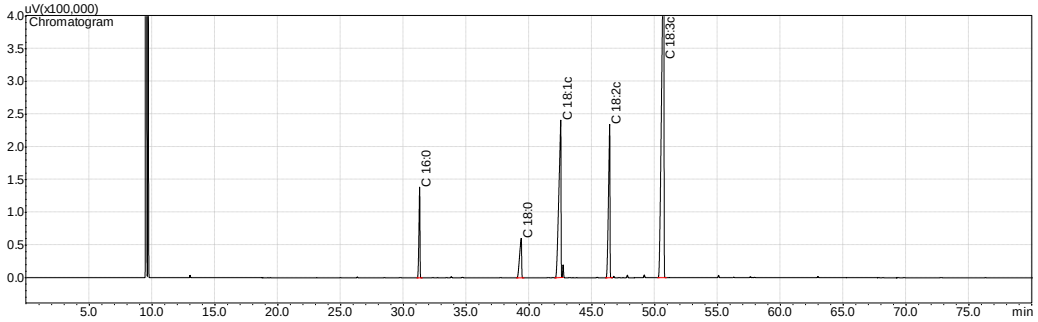
estresse oxidativo, onde foi observado que a suplementação com PSO diminui as transaminases e a área de lesão. No entanto, fornece substrato para o ataque dos radicais livres, aumentando o nível de hidroperóxidos lipídicos no fígado, embora não promova alterações na atividade das enzimas antioxidantes.

Os resultados aqui apresentados colaboram com mais informações a respeito dos efeitos da suplementação com óleo rico em CLNA em ratos saudáveis e submetidos a estresse oxidativo, contribuindo com a literatura a respeito do uso dos conjugados nesses modelos. De acordo com o observado neste trabalho, o óleo da semente de romã não é recomentado para cosumo com o objetivo de promover a perda de peso e melhorar a condição antioxidante. O CLNA/PA, assim como seu metabólito (CLAs), pode inclusive provocar efeitos adversos como o acúmulo de lipídeos nos tecidos, aumento das células adiposas e fornecimento de substrato para o ataque do radical livre em condição de estresse oxidativo. Neste sentido, mais estudos são necessários a fim de avaliar o efeito dos conjugados em diferentes condições, para que se possa confirmar os seus reais efeitos e estabelecer possíveis recomendações e/ou limitações para o seu uso.

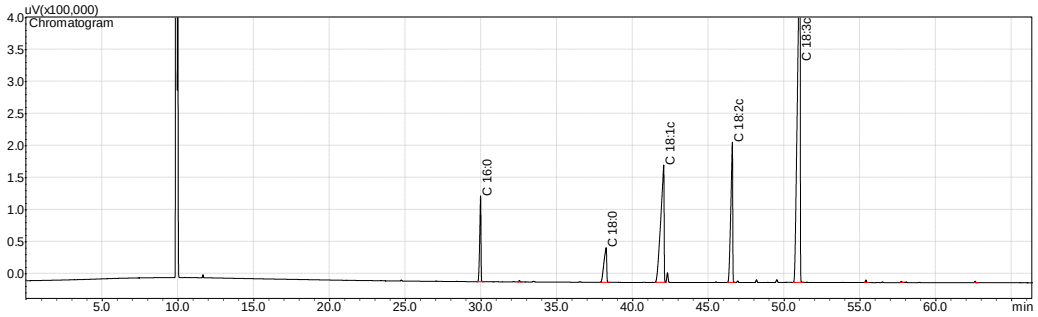
ANEXOS

(A) Cromatogramas correspondentes ao óleo de linhaça nas três diferentes condições cromatográficas: (a) CC 1, (b) CC 2 e (c) CC 3.

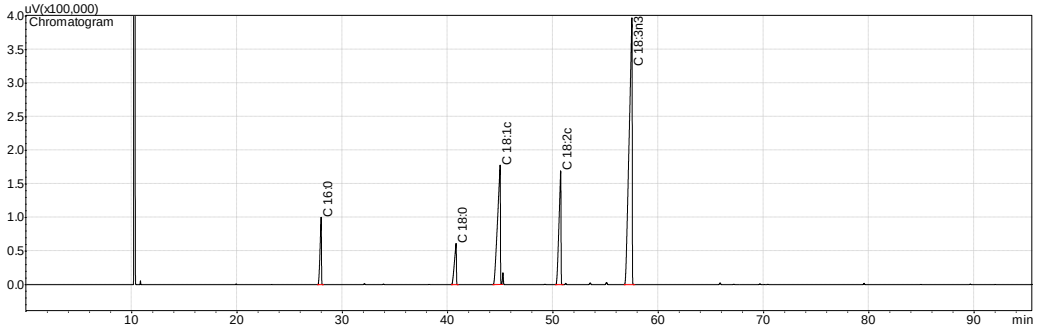
a



b

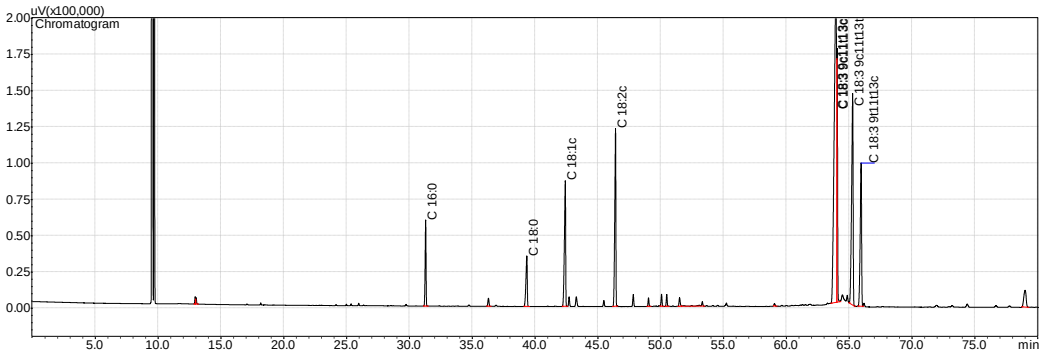


c

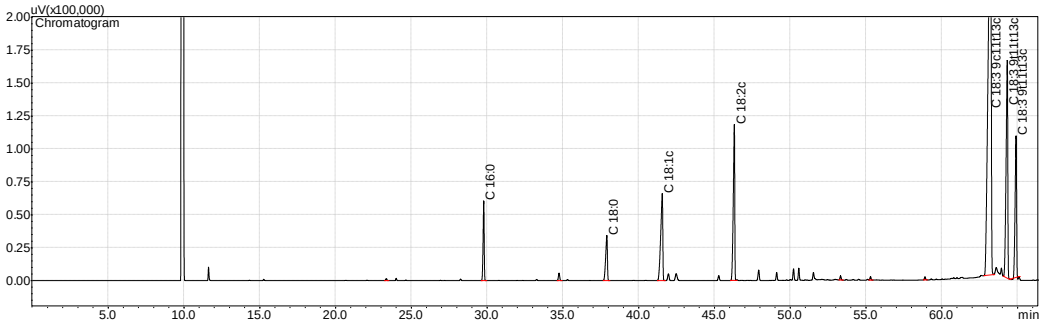


(B) Cromatogramas correspondentes ao óleo da semente de romã nas três diferentes condições cromatográficas: (a) CC 1, (b) CC 2 e (c) CC 3.

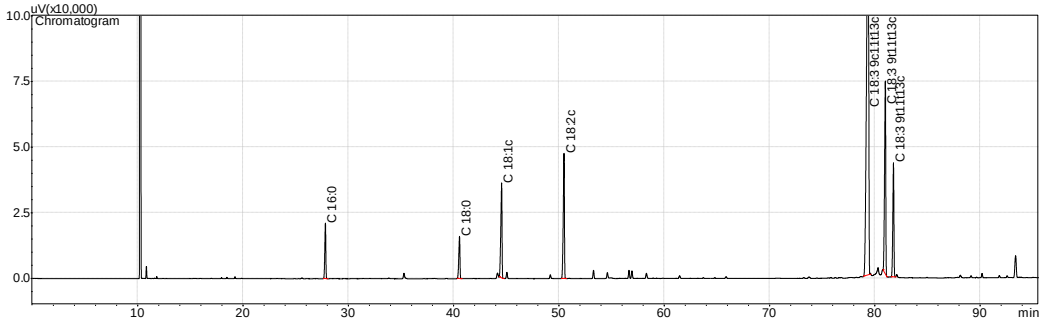
a



b

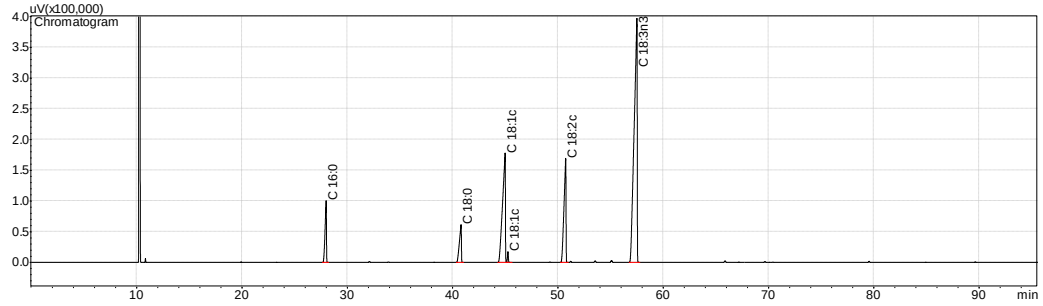


c

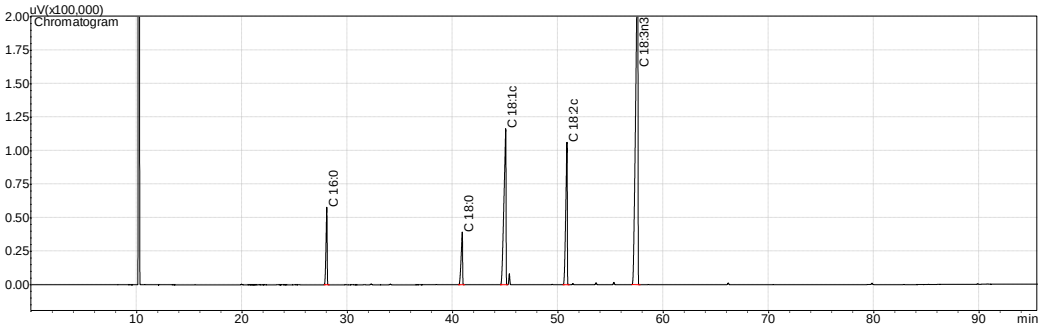


(A) Cromatogramas correspondentes ao óleo de linhaça nos dois diferentes métodos de esterificação: (a) mista e (b) alcalina. Condição cromatográfica CC 3 (Baublits et al., 2007).

a

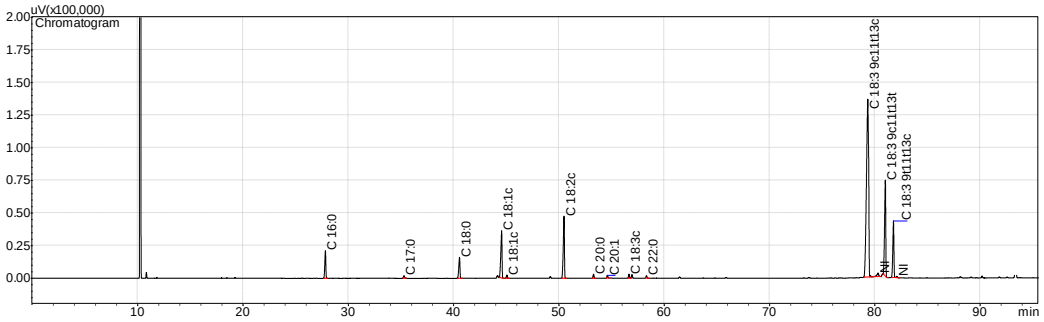


b

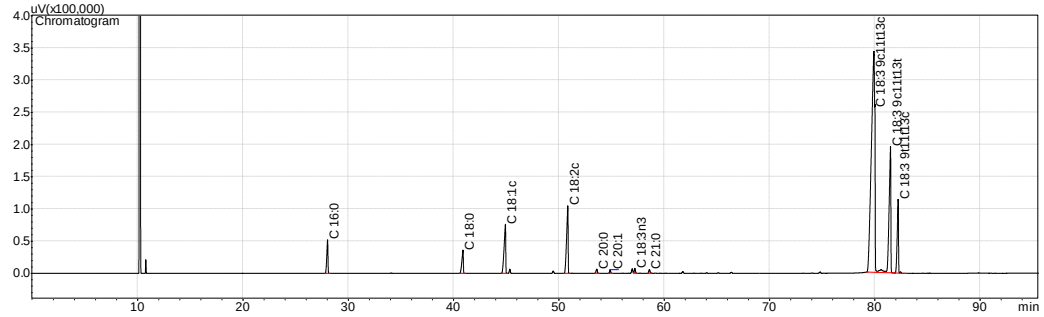


(B) Cromatogramas correspondentes ao óleo da semente de romã nos dois diferentes métodos de esterificação: (a) mista e (b) alcalina. Condição cromatográfica CC 3 (Baublits et al., 2007). NI = Não identificado.

a

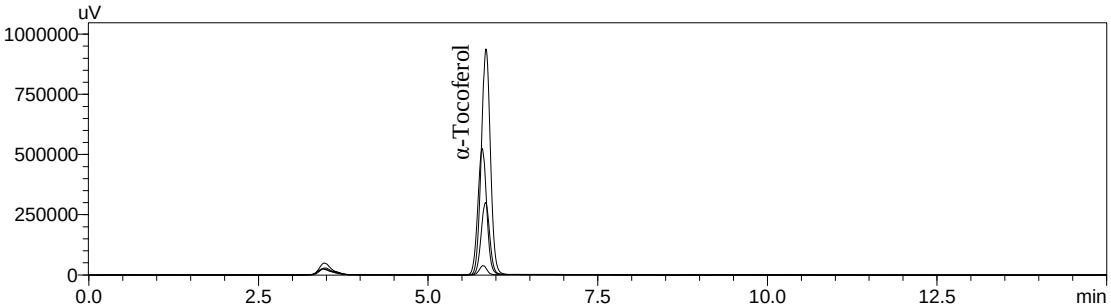


b

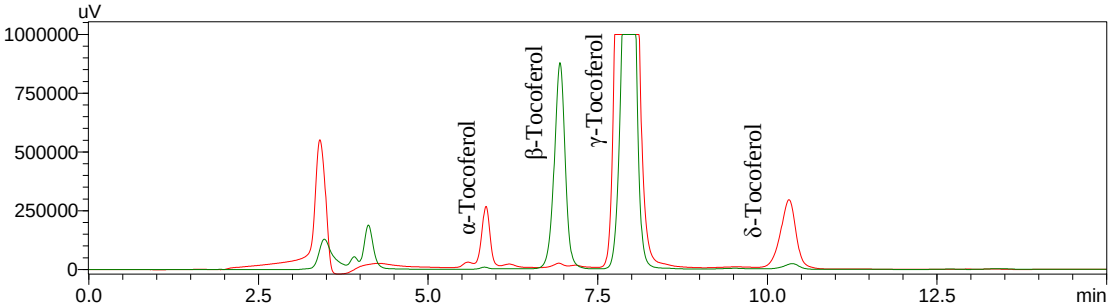


(A) Cromatogramas: (a) padrão de α-tocoferol e (b) tocoferóis presentes nas amosras de óleos, onde a linha verde correponde ao óleo de linhaça e a linha vermelha ao da semente de romã.

a

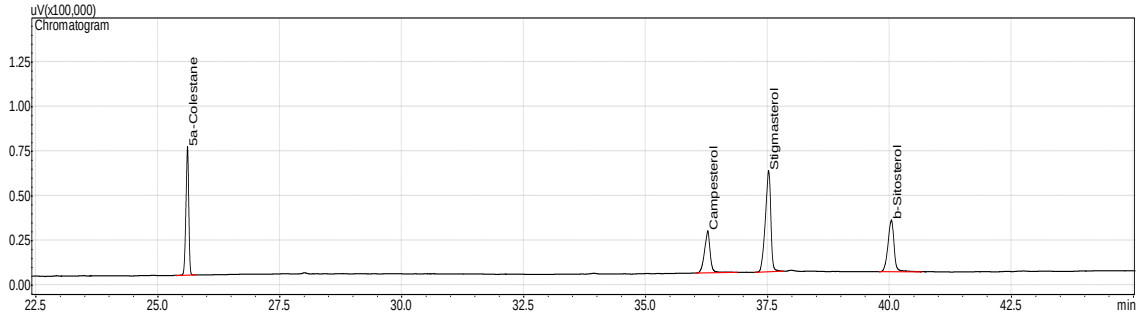


b

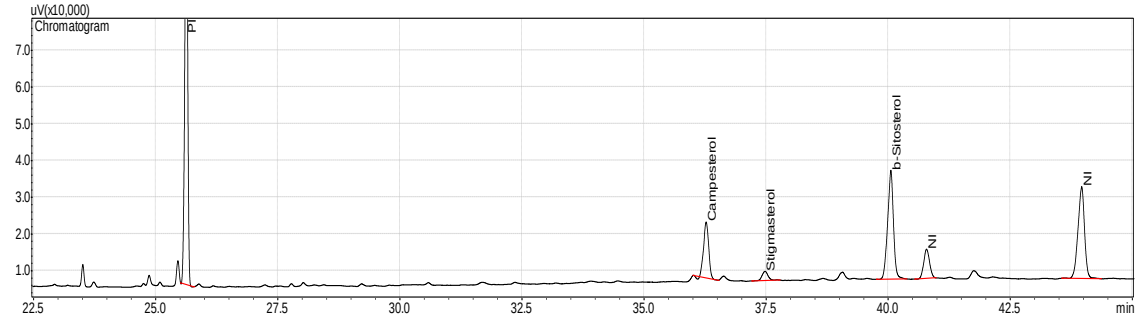


(B) Cromatogramas: (a) padrões de fitosteróis, (b) óleo de linhaça e (c) óleo da semente de romã. PI = Padrão interno (5α-Colestane) e NI = Não identificado.

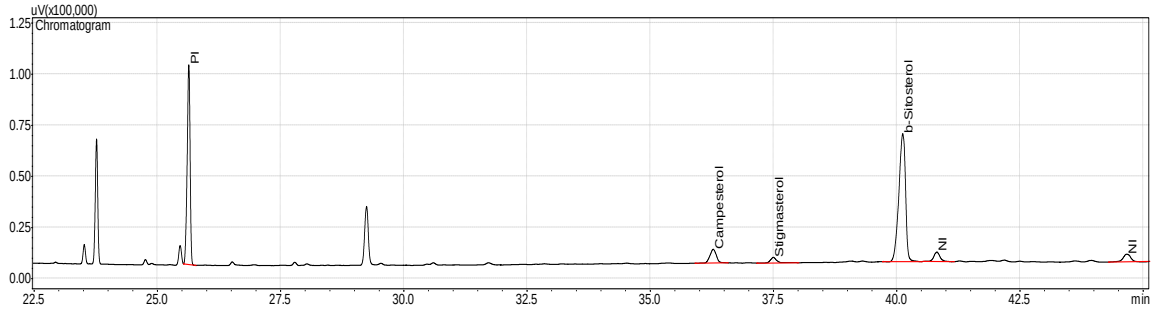
a



b



c



RAÇÃO COMERCIAL

Nuvilab CR-1

Composição do Produto: Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e aminoácidos.

Níveis de Garantia por Quilograma do Produto:

Umidade (máx)	12,50	%
Proteína Bruta (min)	22,00	%
Extrato Etéreo (min)	4,50	%
Matéria Mineral (máx)	10,00	%
Matéria Fibrosa (máx)	8,00	%
Cálcio (máx)	1,40	%
Fósforo (min)	0,80	%

Enriquecimento por Quilograma do Produto:

Vitaminas:Vitamina A 12.000,00 UI; vitamina D3 1.800,00 UI; vitamina E 30,00 mg; vitamina K3 3,00 mg; vitamina B1 5,00 mg; vitamina B2 6,00 mg; vitamina B6 7,00 mg; vitamina B12 20,00 mcg; niacina 60,00 mg; ácido pantotênico 20,00 mg; ácido fólico 1,00 mg, biotina 0,05 mg; colina 600,00 mg.

Microelementos Minerais:Ferro 50,00 mg; zinco 60,00 mg; cobre 10,00 mg; iodo 2,00 mg; manganês 60,00 mg; selênio 0,05 mg; cobalto 1,50 mg.

Aminoácidos: Lisina 100,00 mg; metionina 300,00 mg.

Aditivos: Antioxidante 100,00 mg.

Indicação: Alimento equilibrado para camundongos e ratos de laboratório, baseado em recomendações do NationalResearchCouncil e NationalInstituteof Health – USA.

Uso: Administração à vontade através de comedouros suspensos.

Apresentação: Peletizada (extrusada ou farelada sob consulta).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

Ofício CEEA/FCF nº 72/2008

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "**Avaliação em ratos do efeito do ácido graxo punícico sobre o perfil lipídico tecidual e sua influência sobre parâmetros bioquímicos em processos oxidativos**" (Protocolo nº 204), de responsabilidade da pesquisadora **Illana Louise Pereira de Melo** sob a orientação do(a) Prof. Dr. Jorge Mancini Filho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA, desta Faculdade, em 10 de novembro de 2008.

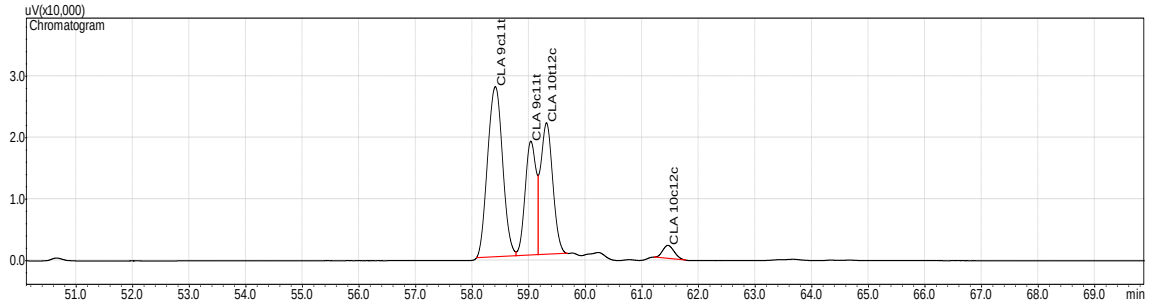
São Paulo, 8 de dezembro de 2008.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da Comissão de Ética
em Experimentação Animal

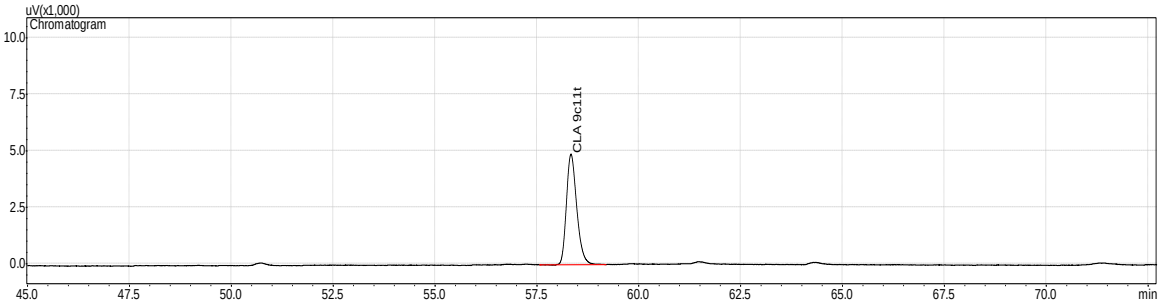
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3677 / Fax: (11) 3813-5093 - e-mail: rtrigo@usp.br

Cromatogramas correspondentes aos padrões de CLAs: (a) Mistura de isômeros de CLAs (Sigma O5632); (b) Isômero 9*c*11*t*-CLA (Sigma 16413).

a



b



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/56/2010

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "**Efeito dos isômeros conjugados do ácido linoléico (9cis, 11trans e 10trans, 12cis) e do ácido α-linolênico (9cis, 11trans, 13ics) no modelo de hepatotoxicidade induzidas por tetracloreto de carbono em ratos**" (Protocolo CEU/FCF/281), de responsabilidade das pesquisadoras **Eliane Bonifácio Teixeira de Carvalho e Ilana Louise Pereira de Melo** sob a orientação do Prof. Dr. Jorge Mancini Filho, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 12 de julho de 2010.

São Paulo, 9 de agosto de 2010.

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br