



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICA
MESTRADO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**“FATOR HIPODISLIPIDÊMICO DO *Olea europaea* E
Theobroma grandiflorum NO PLASMA DE RATOS WISTAR E
ANÁLISE COMPARATIVA DE ÁCIDOS GRAXOS
PRESENTES”.**

SILMARA DA CUNHA PIMENTEL

MANAUS – 2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICA
MESTRADO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

SILMARA DA CUNHA PIMENTEL

**“FATOR HIPODISLIPIDÊMICO DO *Olea europaea* E *Theobroma grandiflorum* NO
PLASMA DE RATOS WISTAR E ANALÍSE COMPARATIVA DE ÁCIDOS GRAXOS
PRESENTES”.**

Orientador: Prof^o. Dr. José Merched Chara

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lúcia K. O. Yuyama (*in Memoriam*)

MANAUS

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P644f	<p>PIMENTEL, Silmara da Cunha. Fator hipodislipemico do Olea europaea e Theobroma grandiflorum no plasma de ratos wistar e análise comparativa de ácidos graxos presentes / Silmara da Cunha Pimentel; orientadores José Merched Chaar e Lúcia K. O. Yuyama (in Memoriam). -- Manaus : [s. n.], 2015.</p> <p>73 f.: il. col.; 30 cm.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Amazonas, 2015. Inclui referências bibliográficas.</p> <p>1. Dislipidemia. 2. Lipidigrama. 3. Cromatografia. 4. Ácido oleico 5. Linoleico. I. Chaar, José Merched II. Título.</p>
-------	--

SILMARA DA CUNHA PIMENTEL

**“FATOR HIPODISLIPIDEMICO DO *Olea europaea* E *Theobroma grandiflorum* NO
PLASMA DE RATOS WISTAR E ANALÍSE COMPARATIVA DE ÁCIDOS GRAXOS
PRESENTES.**

Dissertação apresentada ao setor de Pós-graduação em ciência de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como parte de requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência do Alimentos, área de concentração Tecnologia de Alimentos.

Aprovado em 03 de Agosto de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Rosany Piccolotto Carvalho
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dra. Helyde Albuquerque Marinho
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof. Dr. Jamal Chaar
Universidade Federal do Amazonas

DEDICATORIA

Ao meu pai, minha mãe, meus irmãos, meu esposo e minha filha Luana Pimentel, pelo incentivo para realização deste trabalho.

AGRADECIMENTO

Ao plano superior pela força invisível;

Agradeço primeiramente a minha família: a meu pai Aldérico, pela dedicação e luta para minha educação e formação profissional; a minha mãe Sônia, pelo amor, apoio e compreensão dedicados a mim;

À minha filha, Luana Pimentel Brito, amor da minha vida pela compreensão nas minhas ausências;

Ao meu Esposo, Alessandro Costa dos Santos, pelo amor, incentivo, apoio e por escolher construir sua vida ao meu lado e fazer minha felicidade a cada dia.;

Ao meu orientador Dr. José Merched Charar pelo acompanhamento, por aceitar orientar-me, pelo incentivo ao trabalho, pelo sorriso no rosto, pela paciência incansável e pelo exemplo, não só profissional como também pessoal;

A minha co-orientadora Dr^a. Lúcia K. O. Yuyama (*in Memoriam*) pela disposição e colaboração essencial a realização deste trabalho;

Ao meu co-orientador Dr. Jamal Charar pelo acompanhamento incansável durante a pesquisa;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa;

À FAPEAM – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do pela concessão da bolsa de estudos.

AGRADEÇO

EPÍGRAFE

Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?

Fernando Pessoa

RESUMO

A dislipidemia é uma alteração dos níveis sanguíneos de gordura, uma das patologias com maior incidência na população mundial, considerada atualmente como uma preocupação para a saúde pública. Há fatores que contribuem para o aumento das doenças cardiovasculares, entre estes as dislipidemias, mas o consumo de ácido graxo monoinsaturado (oleico) exerce sobre a colesterolemia um efeito neutro. No entanto, tem se observado que as dietas ricas em ácido oleico aumentam o HDL-c e podem reduzir o nível de LDL-c.. O objetivo foi avaliar o fator hipodislipidêmico e comparar o perfil lipídico e nutricional dos animais tratados com dieta comercial suplementada. e comparar analiticamente os índices físico-químicos de óleos e gorduras de azeite de oliva extra virgem e semente de cupuaçu, respectivamente. Neste estudo comparativo utilizou-se experimentalmente gordura de sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e azeite de oliva (*Olea europaea*) extra virgem como suplemento alimentar em ratos *Wistar* jovens do sexo masculino. No experimento foi utilizado seis grupos de oito animais e cinco deles foram induzidos à dislipidemia por uso de glutamato monossódico. A aplicabilidade foi de 28 dias onde foi oferecida alimentação usual com suplementação (0,1ml a 0,3ml) de um tipo de lipídio em cada grupo também foi realizado estudo analítico, por cromatografia gasosa qualitativa e físico-químico de 2 tipos de azeites de oliva extra virgem e dois lotes de gordura de semente do cupuaçu. Portanto de acordo com os procedimentos de gavagem e via oral não houve diferença, porém entre os exames realizados de colesterol total e triglicérides, o tratamento com gordura de semente de cupuaçu foi o que obteve a melhor ação hipodislipidêmica, Observou-se que azeite de oliva extra virgem e gordura de semente de cupuaçu possuem o mesmo constituinte químico, porem apresentam picos indicativos de quantidades diferentes Contudo verificou-se que as quantidades diferentes podem ser um indicativo de fator hipodislipidêmico também para a gordura de cupuaçu.

Palavras Chave: Dislipidemia, lipidograma, cromatografia, ácido oleico e linoleico

ABSTRACT

Dyslipidemia is a modification in blood levels of fat, one of the higher incidence of the pathologies in the world population, currently regarded as a public health concern. Some factors contribute greatly to increase cardiovascular diseases; among them, the lipid metabolism is one of most important. This factor is related to ingestion of lipid but the consumption of monounsaturated fatty acid (oleic) show neutral effect over cholesterolemia. However, it has been noticed that high oleic acid diets increase High Density Lipoprotein level (HDL-c) and may reduce the Low Density Lipoprotein level (LDL-c). The objective was to evaluate the Dyslipidemia Reduction Factor and compare the lipid profile and nutrition of the animals treated with the commercial diet supplemented and compare physicochemical fat and oil indexes using extra virgin olive oil and cupuaçu fatty seed. In this comparative study was used experimentally fat of cupuaçu seeds (*Theobroma grandiflorum*, Schum.) and olive oil (*Olea europaea*) extra virgin as a food supplementing in Wistar rats male youths. In the experiment were used six groups of eight animals and five of them were induced to dyslipidemia by use of monosodium glutamate. The applicability was 28 days which was provided usual feeding with supplemented of (0.1ml to 0.3ml) of one type of lipid in each group and gas chromatography and physicochemical analysis such as saponification, acidity, peroxide, and free fatty acid levels. So according to the procedures of gavage and oral route there was no difference, however between the lipidogram tests performed, Treatment with fat cupuaçu seed was what achieved the best action of Dyslipidemia Reduction Factor, except for HDL cholesterol that there was no difference in any treatment. Results show that extra virgin olive oil and cupuaçu fatty seed have same fatty acids; although, different amounts for these constituents. These results indicate that different quantities of same fatty acids on different levels may interfere on hipodislipidemic factor for cupuaçu fatty seed diets.

Keywords: Hyperlipidemia, lipid profile, cholesterolemia, chromatography, oleic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Transição Nutricional.....	22
Figura 2	Pirâmide das patologias mais acometidas.....	22
Figura 3	Principais Co-morbidades da Obesidade.....	25
Figura 4	Molécula de triglicerídeo.....	26
Figura 5	Classificação de Lipoproteínas.....	27
Figura 6	Lipoproteínas.....	28
Figura 7	Ratos Wistar com 1 dia de nascimento.....	35
Figura 8	Indução por via subcutânea.....	36
Figura 9	Balança de precisão.....	36
Figura 10	Material para procedimento.....	38
Figura 11	Anestésicos utilizados.....	38
Figura 12	Cirurgia com retirada dos órgãos.....	39
Figura 13	Fígado e coração de um Wistar com a dieta induzida.....	40
Figura 14	Processo de extração do Azeite de Oliva.....	43
Figura 15	Fluxograma de obtenção da gordura de cupuaçu.....	43
Figura 16	Gaiola dos animais.....	46
Figura 17	Histologia hepática.....	52
Figura 18	Histologia Cardíaca.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Constantes físicas e químicas de gorduras de semente de cupuaçu	17
Tabela 2	Composição percentual dos ácidos graxos da gordura de cupuaçu	18
Tabela 3	Composição dos triacilgliceróis da gordura de cupuaçu	19
Tabela 4	Análise centesimal da ração comercial Purina®.....	41
Tabela 5	Tratamentos realizados com os ratos macho da linhagem Wistar.....	46
Tabela 6	Análise de peso inicial e final dos animais.....	47
Tabela 7	Média do valor de colesterol e triglicérides.....	48
Tabela 8	Resultado da análise de sangue para HDL nos tempos.....	49
Tabela 9	Resultado da análise de sangue para LDL nos tempos.....	49
Tabela 10	Resultado da análise de sangue para VLDL nos tempos.....	50
Tabela 11	Análise química dos azeites e gordura de cupuaçu.....	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Função dos lipídios	26
Quadro 2	Resultado das Lâminas hepáticas	52
Quadro 3	Resultado das Lâminas cardíacas	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Comparação entre os principais óleos da dieta	29
Gráfico 2	Variância do colesterol	50
Gráfico 3	Variância do triglicérideo	51
Gráfico 4	Cromatografia azeite gallo®	55
Gráfico 5	Cromatografia azeite andorinha®	56
Gráfico 6	Cromatografia gordura de cupuaçu 2010	57
Gráfico 7	Cromatografia gordura de cupuaçu 2011	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

INPA	Instituto Nacional de Pesquisa as Amazônia
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
GSM	Glutamato Monossódico
CT	Colesterol Total
TG	Triglicerídeos
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
V.O.	Via oral
Gav.	Gavagem
°C	Graus Celsius
n-3	Ácido graxo ômega-3
n-6	Ácido graxo ômega -6
DRI	Recomendações Nutricionais Diárias
AMDR	Alcance de Distribuição de Macronutrientes Aceitáveis
AOAC	Associação Oficial de Métodos Químicos Analíticos
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DCV	Doenças Cardiovasculares
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
LAN	Laboratório de Alimentos e Nutrição
OMS	Organização Mundial de Saúde
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Transição epidemiológica	21
2.2 Dislipidemia	23
2.3 Lipídios	26
2.4 Ácidos graxos essenciais	28
2.5 Gordura da semente de cupuaçu	30
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 METODOLOGIA	31
4.1 Modelo de Estudo	31
4.2 Informações éticas e financeiras	31
4.3 Delineamento experimental	31
4.4 Indução a dislipidemia	32
4.5 Avaliação nutricional	33
4.6 Coleta de sangue	34
4.7 Análise do perfil lipídico	34
4.8 Protocolo da gavagem	34
4.9 Tratamento com óleo e gordura	36
4.10 Eutanásia dos animais	36
4.11 Análise histológica do coração e fígado	37
4.12 Análise centesimal da ração comercial	38
4.13 Análise estatística	39
4.14 Preparação dos óleos e gorduras para análises	39
4.15 Determinação da composição dos óleos por cromatografia gasosa	41
5 DELINEAMENTO DA PESQUISA	42
5.1 Fluxograma	42
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.1 Fator hipodislipidêmico	43
6.2 Análise histológica	50

6.3	Análise e Cromatografia	52
	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58
	APÊNDICES	61

1. INTRODUÇÃO

No Brasil as mudanças socioeconômicas e epidemiológicas permitiram que ocorresse a denominada transição nos padrões nutricionais, associado às dislipidemias. Isso se torna um problema de saúde pública (PEREIRA, et al., 2003). Em decorrência dos novos hábitos alimentares, bem como o novo estilo de vida, o homem fica exposto a uma gama de fatores de riscos para as doenças da modernidade. (VOLP, et al., 2009). Atualmente passamos por um processo de transição alimentar e nutricional, que ocorrem anteriormente e/ou simultaneamente. O primeiro é a transição demográfica, que ocorre o envelhecimento da população, aliada a um aumento na expectativa de vida devido a melhorias nas condições de vida na população.

O outro processo concomitante é o de transição epidemiológica, caracterizada por uma redução das prevalências de doenças infectocontagiosas associadas à desnutrição, junto a este processo, ocorre aumento das prevalências de doenças crônicas não-transmissíveis, associado a um padrão de vida mais urbano e industrializado. Muitas mudanças ocorreram, no padrão alimentar da população refletindo em mudanças na composição corporal. Sociedades modernas têm suas dietas próprias substituídas por dietas ricas em açúcar, sódio, gordura e pobres em fibras (BRASIL, 2009).

Segundo Levy-Costa et al. (2005) Nos últimos trinta anos a dieta do brasileiro se modificou havendo uma persistência do consumo excessivo de açúcar e insuficiente de frutas e hortaliças e aumento sistemático no teor da dieta em gorduras em geral e em gorduras saturadas, essas características, demonstram um padrão alimentar cada vez mais inadequado, com dietas de alto valor energético, com alto teor de gorduras e pobre em micronutrientes e

fibras, contribuindo para o aumento da obesidade e das doenças crônicas não transmissíveis. O aumento do consumo de gordura associa-se à elevação da concentração plasmática de colesterol e à maior incidência de aterosclerose coronária e aórtica. A quantidade e o tipo da gordura ingerida influencia a concentração do colesterol plasmático (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998; CHAMPE & HARVEY, 2000).

A flora brasileira possui mais de 25 mil plantas nativas, isso somente na Amazônia e com enorme potencial de investigação científica, esses produtos podem ser utilizados como alimentos funcionais a fim de melhorar as condições clínicas nos tratamentos de doenças crônicas. A possibilidade do uso de alimentos na redução de risco de doenças crônicas não transmissíveis tem sido assunto constante em eventos na área de alimentação e nutrição e, neste contexto, surgiram os alimentos funcionais. Alimentos funcionais são definidos como qualquer substância ou componentes de um alimento que proporciona benefícios para a saúde, inclusive a prevenção e o tratamento de doenças (BACHUR et al., 2009).

Considerando que a alimentação tem o papel primordial na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares, o modelo experimental teve como intuito verificar o impacto da suplementação com azeite de oliva extra virgem e gordura de semente de cupuaçu, como fator hipodislipidêmico dos níveis plasmáticos de animais.

Vários trabalhos científicos mostram que componentes químicos do azeite de oliva relacionam-se com a saúde de seres humanos tais como fenóis, esqualeno, óleos e gorduras. A literatura indica que o consumo do azeite de oliva é um dos responsáveis pela baixa incidência de cânceres e de doenças coronarianas nos países mediterrâneos (ORTEGA et al., 2006). O uso cotidiano de azeite de oliva extra virgem, pode fornecer uma quantidade suficiente de antioxidantes ao corpo, capaz de reduzir a oxidação pela inibição da peroxidase lipídica, fator relacionado às doenças coronarianas, câncer e envelhecimento.

Por outro lado, todos os componentes do óleo de oliva são lipossolúveis o que facilita a sua absorção e transporte pelo corpo. O restante dos componentes não absorvidos permanece na luz intestinal protegendo as células contra a oxidação e conseqüentemente, o desenvolvimento do câncer (HUANG e SUMPIO, 2008). Finalmente, Owen et al. (2000) acredita que este estudo trouxe respostas a respeito do papel do azeite de oliva extra virgem, e de seus componentes antioxidantes, na proteção da saúde contra câncer, doenças coronarianas e envelhecimento.

A substituição dos ácidos graxos saturados por ácidos graxos poliinsaturados reduz o colesterol total e o colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade) no sangue. As novas recomendações indicam que os ácidos graxos poliinsaturados devem participar em até 10% do total de calorias ingeridas diárias (DRI, 2005). Existem dois tipos de ácidos graxos poliinsaturados, os representados pelas séries ômega-3 (alfa-linolênico C18:3, eicosapentaenoico - EPA e docosaexaenoico - DHA) e ômega-6 (linoleico C18:2 e araquidônico C20:0).

Os ácidos graxos ômega-3 são encontrados em peixes de águas profundas e frias. As fontes de ácido alfa-linolênico são os tecidos verdes das plantas, do óleo de canola e de soja. Os óleos de peixe ricos em ácidos eicosapentaenóico e docosaexaenóico também reduzem os triglicérides. Os ácidos graxos monoinsaturados devem participar em até 20% das calorias totais por dia. Os alimentos que apresentam maior conteúdo de ácido oléico são o óleo de oliva (65 - 80%), óleo de canola (65 - 70%) e o abacate (45 - 50%) (SOCESP, 2012).

Atualmente, o uso de óleos vegetais transformados (transesterificados) tem sido uma fonte de grande impacto econômico e social, a transesterificação de óleos vegetais, já é bastante conhecida, todavia o problema maior é a quantificação dos ésteres formados (etil éster ou metil éster, de acordo com o álcool). Dependendo do tempo da reação e das razões

entre reagentes, além do éster, podemos ter também mono, di e triglicerídeos. Sem dúvida, a cromatografia é a técnica analítica convencional mais utilizada para identificação de óleos (FROEHNER et al., 2007).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Transição epidemiológica

A transição epidemiológica é caracterizada pela evolução progressiva de um perfil de mortalidade por doenças infecciosas, isto é, à medida que as doenças transmissíveis sujeitas à vigilância vão se tornando mais raras, a importância política dos órgãos governamentais que tratam do controle dessas doenças também vai diminuindo (BARATA, 1997); por outro lado, predominam os óbitos por doenças cardiovasculares, neoplasias e outras doenças consideradas crônico-degenerativas (PRATA, 1992).

Uma nova epidemia pode estar sendo incubada agora mesmo em uma mega cidade, sem saneamento e super povoada, do mundo não desenvolvido ou nas florestas remotas da África, América do Sul ou Ásia- regiões esparsamente povoadas que recentemente têm sido alteradas pela civilização moderna. (KRAUSE, 1992).

Na África a partir do século XIX enquanto a expansão colonialista foi, em grande parte, responsável pelo aumento da oferta de alimentos em quantidade e qualidade, na Europa, a modificação das culturas tradicionais e da estrutura produtiva por parte do colonizador reduziu a oferta de alimentos localmente (PRATA, 1992).

Os diversos países da América Latina estão experimentando nos últimos vinte anos uma rápida transição demográfica, epidemiológica e nutricional. As características e os estágios de desenvolvimento da transição diferem para os vários países da América Latina (KAC & MELÉNDEZ, 2003).



Figura 1. Transição Nutricional.

Fonte: Kac & Meléndez, (2003); Barata (1997); Prata (1992)

Contudo, no Brasil, ao mesmo tempo em que reduz a ocorrência da desnutrição em crianças, adolescentes, adultos e mulheres com idade reprodutiva em ritmo acelerado, aumenta a prevalência de sobrepeso e obesidade na população brasileira. Isto demonstra um antagonismo de tendências temporais entre desnutrição e obesidade, definindo uma das características marcantes do processo de transição nutricional. Nesse aspecto, o problema apresentou na década de 90 uma característica inesperada, revelou que pessoas de renda mais baixa passaram a ter maior frequência de acometimento dessas doenças (BATISTA FILHO & RISSIN, 2003), além do incremento do estilo de vida sedentário e do consumo inadequado de dietas (KAC & MELÉNDEZ, 2003).



Figura 2. Pirâmide das patologias mais acometidas.

Fonte: Kac & Meléndez, (2003); Barata (1997); Prata (1992)

Segundo Bortoli (2011), as mudanças na alimentação se devem, entre outros motivos, à oferta dos alimentos industrializados, redução do tamanho da família, aumento da disponibilidade de alimentos e facilidade de acesso da população, inclusive de baixa renda, a alimentos muito calóricos contendo altas concentrações de gorduras e açúcares. O efeito das dietas ricas em carboidratos, especialmente os carboidratos refinados, pode aumentar a incidência de sobrepeso e obesidade, gerando um estado metabólico que favorece o agravamento da dislipidemia aterogênica, caracterizada pela elevação de triglicérides, redução dos níveis de colesterol HDL e aumento das concentrações de colesterol LDL.

Pendleton (1985), afirma que os estágios de transição demográfica das sociedades em desenvolvimento durante o século XX levaram ao declínio da mortalidade devido a medidas preventivas de saúde e quando isso ocorre, ou seja, se alcança uma menor taxa de mortalidade, o desenvolvimento econômico passa a ser o responsável pelo declínio subsequente da mortalidade infantil e pelo aumento da expectativa de vida nestas sociedades.

No Brasil, ambos os mecanismos de mudança do padrão de mortalidade: A adoção de medidas preventivas e o desenvolvimento econômico ocorrem simultaneamente (WOOD & CARVALHO, 1988).

O passo e a velocidade da mudança na mortalidade nos últimos 40 anos sugerem que tanto a difusão de tecnologias de controle quanto à melhoria no padrão de vida tiveram o seu papel. (Wood & Carvalho, 1988)

2.2 Dislipidemia

Níveis plasmáticos de lipídios têm sido correlacionados com a predisposição para doenças cardiovasculares. A base fisiopatológica das dislipidemias primárias é o acúmulo de quilomícrons e/ou de Lipoproteínas de Baixíssima Densidade – VLDL no compartimento

plasmático resultando em hipertrigliceridemia provocada pela diminuição da hidrólise dos triglicérides destas lipoproteínas pela lipase lipoprotéica ou do aumento da síntese de VLDL. O acúmulo de lipoproteínas ricas em colesterol como a LDL no compartimento plasmático resulta em hipercolesterolemia e este acúmulo pode ocorrer por doenças monogênicas decorrentes de defeito no gene do receptor de LDL (S.B.C., 2007).

O colesterol é um composto químico sintetizado pelo fígado, do qual o organismo necessita e cujo complemento é adquirido dos alimentos ingeridos. Ambas as alterações de níveis do colesterol muito altas quanto as muito baixas são perigosas à saúde. Por ser solúvel apenas em gorduras, tem que ser transportado pelo sangue através das seguintes lipoproteínas: VLDL, LDL (lipoproteína de baixa densidade) e HDL (lipoproteína de alta densidade). O fígado acondiciona os triglicérides na forma de VLDL e os despacha, pela corrente sanguínea para as células, juntamente com menores quantidades de colesterol e proteínas. É então que as células armazenam e utilizam essa quantidade de gorduras como "combustível". Assim, o VLDL, sem as gorduras, passa a ser denominado como LDL, já que é composto basicamente de colesterol e proteínas. O excesso desta lipoproteína no organismo fixa-se nas paredes das artérias, entupindo-as e propiciando os ataques cardíacos ou infartos. Por sua vez, o HDL faz o papel contrário, extraindo o colesterol das paredes das artérias, devolvendo-o ao fígado para ser excretado (S.B.E.M., 2011).

De acordo com Bortoli (2011) o acúmulo de gordura na região abdominal, favorece a prevalência de dislipidemias, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. O tecido adiposo abdominal apresenta maior atividade metabólica, liberando grande quantidade de ácidos graxos livres que provocam o aumento nos níveis de triglicérides.

Portanto, estudos recentes têm demonstrado que indivíduos que consomem grandes quantidades de gordura, principalmente saturada, têm níveis mais elevados de colesterol sérico do que aqueles que consomem quantidades menores, outros mostram que o excesso de

peso e o perfil biofísico andróide estão associados a alterações das concentrações sanguíneas de lipídeos que são definidas como dislipidemia. Portanto, a redução da colesterolemia, mesmo que pequena, parece ser eficiente na diminuição dos índices de mortalidade por doenças cardiovasculares (McCABE, 1993).

Indivíduos obesos, especialmente com predomínio da gordura visceral, apresentam valores maiores de triglicerídeos de jejum e menores de HDL. Os acontecimentos iniciais do processo metabólico pós-prandial incluem ingestão, digestão e absorção dos lipídeos (LIMA et al., 2002). Cerca de 95% da gordura ingerida está na forma de triglicerídeos (COHN, 1998).

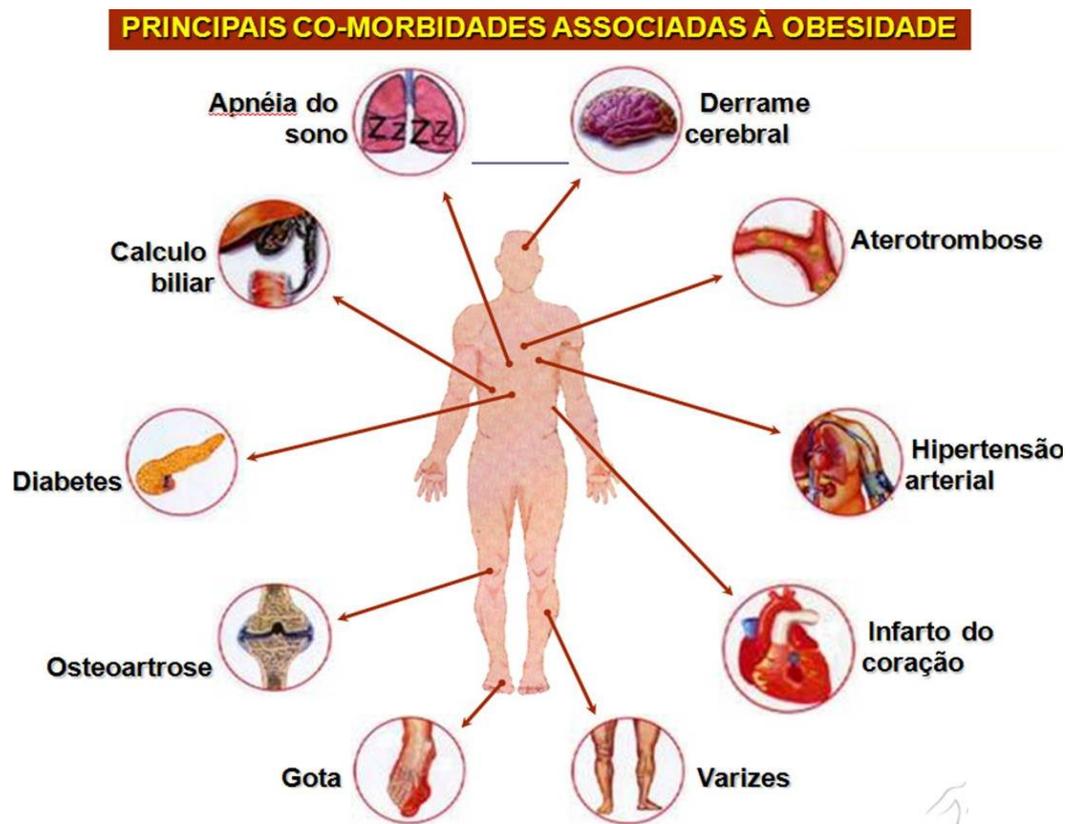


Figura 3 .Principais Co-morbidades da Obesidade .
Fonte: SBC, 2012

2.3 Lipídios

Do ponto de vista fisiológico e clínico, os lipídios biologicamente mais relevantes são os fosfolípides, o colesterol, os triglicérides (TG) e os ácidos graxos (S.B.C.; 2007).

Quadro 1: Funções dos lipídios:

Fornecer 9kcal/g, ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K)
Funcionar como estoque de combustível energético não-glicídico (95% na forma de triglicérides), utilizado principalmente no jejum
Prover proteção mecânica (a ossos e órgãos) e manutenção da temperatura corpórea
Participar da síntese de estruturas celulares, como a membrana fosfolipídica celular
Participar da síntese de hormônios
Transportar vitaminas lipossolúveis
Funcionar como mediadores intra e extracelulares da resposta imune
Participar no processo inflamatório e no estresse oxidativo.

Fonte: Waitzberg (2000).

Os triglicerídeos são ésteres formados a partir da reação do glicerol com três unidades de ácidos graxos dodecanóico, como mostra o exemplo na Figura 1.

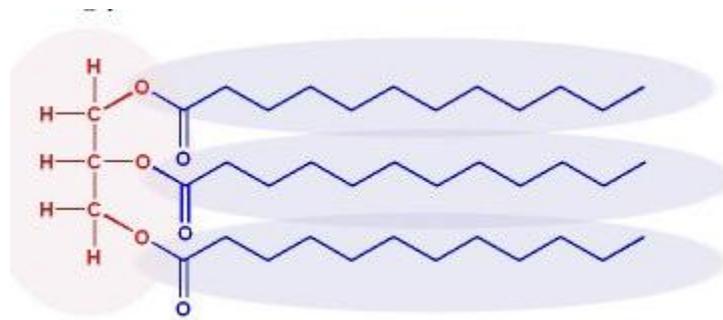


Figura 4. Molécula de triglicerídeo.

Fonte: Waitzberg (2000)

Os ácidos graxos podem ser classificados como saturados (sem duplas ligações entre seus átomos de carbono), monoinsaturado ou poliinsaturado de acordo com o número de ligações duplas na sua cadeia. Não apenas a quantidade, mas também a qualidade dos ácidos graxos oferecidos tem importância na regulação de parâmetros metabólicos. A posição e o número de insaturações são capazes de alterar o metabolismo de diversas formas (OAKI & SEELAENDER, 1999).

No metabolismo dos lipídios as gorduras são digeridas no estômago e no intestino pelas respectivas lipases. Tais produtos lipolíticos são solubilizados pelos ácidos biliares, formando micelas lipídicas absorvidas pelos enterócitos. Dentro destas células, os ácidos graxos livres e os monoglicerídeos são esterificados, formando novamente os triglicerídeos que, no Complexo de Golgi, formarão grandes moléculas (quilomícrons) através da adição de apolipoproteínas determinantes de características estruturais e funcionais. Os quilomícrons, por exocitose, são lançados nos espaços intercelulares e ganhando a circulação sistêmica via vasos linfáticos. Seu catabolismo se inicia com a ação da lipase lipoprotéica localizada na superfície das células endoteliais e depende da presença de apolipoproteínas proveniente do HDL circulante (COHN, 1998). Cerca de 80 a 90% do triglicerídeo é degradado, reduzindo-se então o diâmetro dos quilomícrons. As apolipoproteínas são transferidas juntamente com fosfolipídios para o HDL que, por sua vez, doa apolipoproteínas que têm papel importante no reconhecimento e captação de quilomícrons pelo fígado (LIMA, 2002).

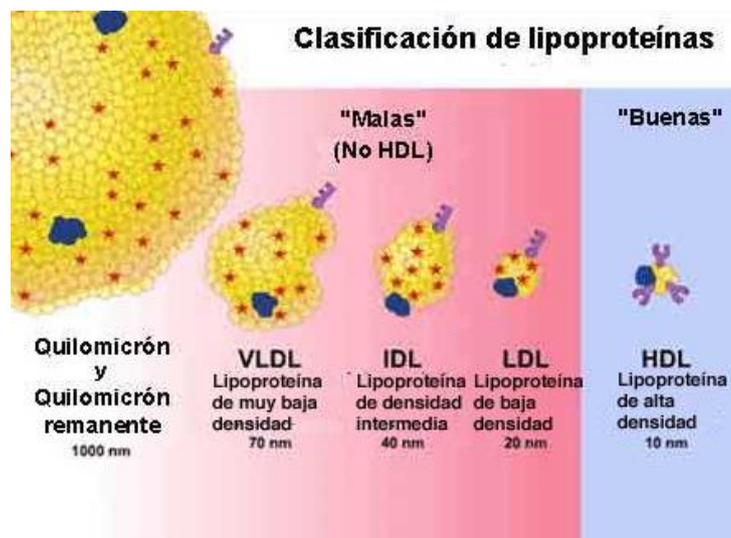


Figura 5. Classificação de Lipoproteínas.
Fonte: Soc. Brasileira de Cardiologia, 2012.

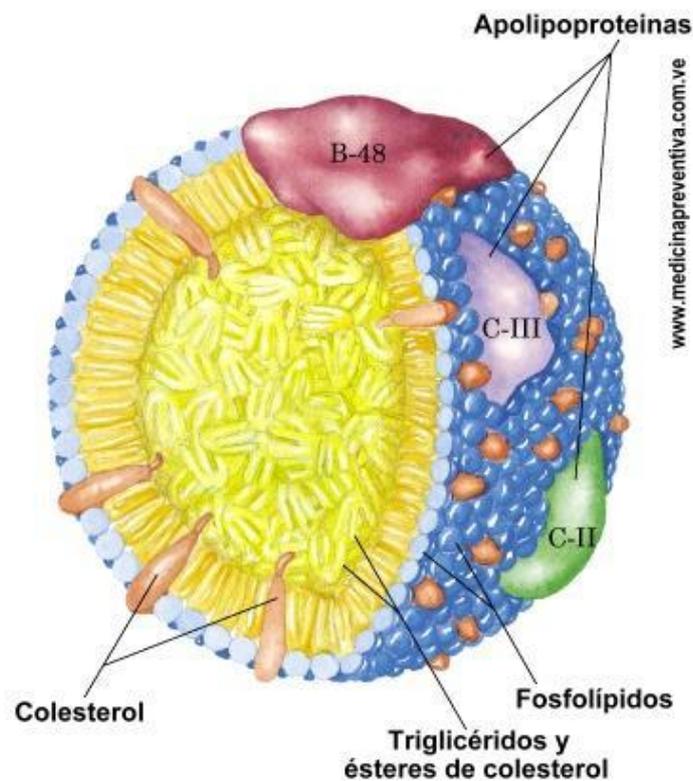


Figura 6. Lipoproteínas.
Fonte: Soc. Brasileira de Cardiologia, 2012.

2.4 Ácidos graxos essenciais

Os ácidos graxos foram vistos, até o início do século XX, exclusivamente como uma forma eficiente de armazenar energia, podendo ser sintetizados pelo organismo a partir de proteínas e carboidratos. Desde então, várias evidências apontaram que dieta pobre em ácidos graxos é associada a síndromes que podem levar à morte. Criou-se o conceito de ácidos graxos essenciais - ácidos graxos imprescindíveis ao organismo, que não podem ser sintetizados pelo mesmo e que, portanto, devem ser oferecidos na alimentação. Autores descrevem que apenas as duas famílias de ácidos graxos são essenciais: os ácidos graxos ômega-3, representados pelo ácido alfa-linolênico e os ácidos graxos ômega-6, representados pelos ácidos linoléico e araquidônico. A importância dos ácidos graxos n-6 é conhecida desde os meados de 1930. Já os ácidos graxos n-3, somente após 1980, tiveram a sua necessidade

associada à prevenção, principalmente, de distúrbios neurológicos e visuais. Dessa forma, a composição da gordura alimentar pode influenciar várias funções relacionadas à membrana, tais como: ligação de hormônios e atividades associadas a enzimas e transportadores. (CARMO & CORREIA, 2009). Porém não há estudos científicos que comprovem o benefício do ácido graxo ômega 9.

Os ácidos graxos omega-3 provocam uma redução na produção das VLDL e modificam o metabolismo das prostaglandinas. Seu efeito sobre as lipoproteínas requer doses elevadas (10-20g/dia), limitando-se seu uso eventual à associação com os fibratos, em raros casos de hipertrigliceridemias resistentes. Entretanto, o excesso de ingestão de ômega-3 pode retardar a coagulação sanguínea. (SANTOS et al., 1999).

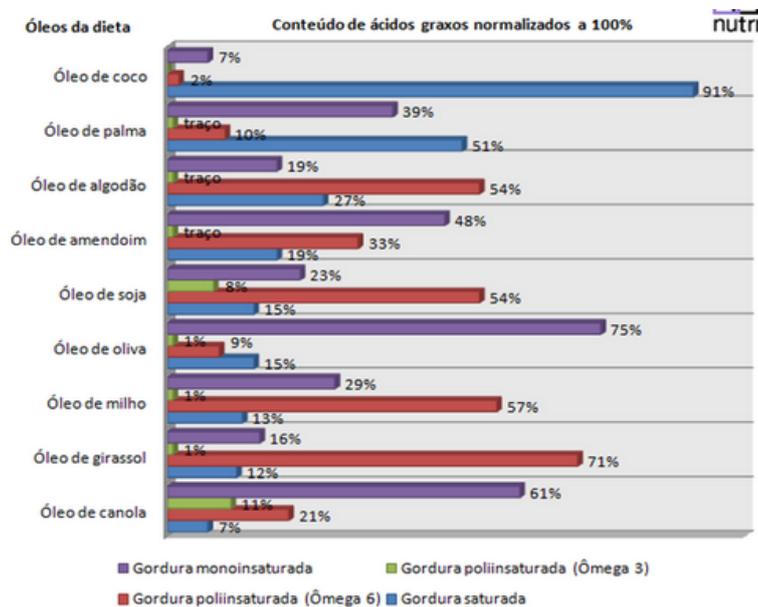


Gráfico 1 – Comparação entre os principais óleos da dieta
Fonte: Pilot Plant Corporation, 2010.

2.5 Gordura da semente de cupuaçu

Óleos e gorduras são extraídos a partir de diferentes fontes vegetais e animais, têm um papel fundamental na alimentação humana, pois além de fornecerem calorias, agem como veículo para as vitaminas lipossolúveis, como A, D, E e K, são fontes de ácidos graxos essenciais como o linoleico, linolênico, araquidônico e contribuem para o sabor dos alimentos (SARAIVA, 2008).

Os óleos são líquidos à temperatura ambiente, pois possuem principalmente TAGs (triglicerídeos) derivados de ácidos graxos insaturados que diminuem o ponto de fusão, enquanto as gorduras estão no estado sólido, devido a maior presença de TAGs (triglicerídeos) com cadeias graxas saturadas (MORISSON, 1995).

Quando são avaliadas as opções de óleos provenientes da flora amazônica, os benefícios vão além do forte apelo de *marketing* e da oportunidade de preservar o meio ambiente. Nesta área existe a necessidade de transformar o conhecimento popular dos povos nativos da Amazônia em conhecimento científico. Contudo é necessário conhecer as propriedades e composição dos óleos e gorduras vegetais amazônicos para o desenvolvimento de novos produtos (SARAIVA, 2008).

A gordura de cupuaçu apresenta as seguintes constantes químicas segundo Vasconcelos et al. (1975).

Tabela 1 – Constantes físicas e químicas de gorduras da semente de cupuaçu.

Constantes	Cupuaçu
pH	5,7
Ponto de fusão (°C)	32 - 34
Densidade específica (25/25°C)	0,9074
Índice de refração	1,4583
Índice de acidez	4,2
Índice de iodo	45,9
Índice de saponificação	174,6
Insaponificáveis (%)	0,6

Fonte: Vasconcelos et al. (1975) - adaptado.

Tabela 2 – Composição percentual dos ácidos graxos da gordura de cupuaçu.

Ácidos graxos	Gordura de cupuaçu
Ácido mirístico (C14:0)	0,08
Ácido palmítico (C16:0)	11,25
Ácido palmitoléico (C16:1)	0,4
Ácido esteárico (C18:0)	38,09
Ácido oleico (C18:1)	38,79
Ácido linoleico (C18:2)	2,39
Ácido linolênico (C18:3)	0,22
Ácido araquídico (C20:0)	7,97
Ácido Behênico (C22:0)	0,74
Saturados (%)	58,13
Monoinsaturados (%)	39,19
Poliinsaturados (%)	2,61

Fonte: Cohen et al. (2009) - adaptado.

Dentre os principais ácidos graxos presentes na gordura de cupuaçu, têm-se os ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1), linoléico (C18:2) e araquídico (C20:0), totalizando 98,49%. A gordura de cupuaçu apresenta significativos teores de ácidos graxos monoinsaturados 39,19% e poliinsaturados 2,61%, o que a caracteriza ser uma gordura macia (COHEN, 2009). Portanto a gordura de cupuaçu apresenta ponto de fusão (32 a 34°C), o seu alto teor de ácidos graxos monoinsaturados, principalmente o ácido oléico, torna esta gordura mais macia (LUCCAS, 2001).

Tabela 3 – Composição dos triacilgliceróis da gordura de cupuaçu.

Triacilgliceróis	Gordura de cupuaçu
PLiP	0
OOO	2,58
POO	3,98
PLiS	0,8
POP	0,95
SOO	16,38
POS	11,87
OOA	9,01
SOS	30,18
PSS	1,5
SOA	18,24
OAA	3,86
Outros	0,65
SUS (saturada, insaturada, saturada)	62,04
SSS (saturada, saturada, saturada)	1,5
SUU (saturada, insaturada, insaturada)	20,36
UUU (insaturada, insaturada, insaturada)	2,58
UUS (insaturada, insaturada, saturada)	9,01
USS (insaturada, saturada, saturada)	3,86
Fonte: Cohen et al. (2009) - adaptado.	
P - palmítico; S - esteárico; O - oleico; Li - linoleico; A - araquídico.	

A gordura de cupuaçu apresentou teores de OOO, PLiS, OOA, PSS e OAA correspondendo a 17,75% do total de triacilgliceróis. Segundo Cohen et al. (2009) a gordura de cupuaçu apresenta alto teor de triacilgliceróis simétricos do tipo SUS (saturado, insaturado, saturado) o que pode indicar que tem características de cristalização similares as da manteiga de cacau.

Contudo fazem-se necessários estudos mais aprofundados da influencia da gordura de cupuaçu no metabolismo lipídico, especialmente no perfil lipídico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar e comparar o perfil lipídico, nutricional, cardiovascular e hepático de ratos wistar tratados com dieta suplementada com gordura de cupuaçu e com azeite de oliva.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Verificar o aumento de peso através da avaliação nutricional;

3.2.2 Determinar e comparar perfis lipídicos de diferentes grupos de animais submetidos a dietas pré-estabelecidas;

3.2.3 Avaliar consequências das dietas testadas quanto ao comprometimento cardíaco e hepático dos animais;

3.2.4 Comprovar a composição centesimal da ração comercial;

3.2.5 Identificar ácidos graxos presentes na gordura de cupuaçu e azeite de oliva através de cromatografia gasosa.

4. METODOLOGIA.

4.1 Modelo de Estudo.

Tratou-se de estudo experimental tecnológico de avaliação dos efeitos da gordura de cupuaçu no perfil lipídico de ratos Wistar. Para tal, realizou-se uma análise fatorial de módulos independentes totalmente casualizados.

4.2 Informações éticas e financiamento.

O protocolo foi apresentado ao Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal do Amazonas (CEEA-UFAM) e foi aprovado pela Comissão de Ética de Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Amazonas, Sob o nº 053/2011. Todos os ensaios biológicos foram realizados de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

O órgão financiador desta pesquisa foi a FAPEAM (Fundação de Amparo a Pesquisa no Amazonas).

4.3 Delineamento experimental.

Animais de laboratório foram mantidos em condições rigidamente controladas consumindo a dieta sugerida e mantidos livre de patógenos e germes, e podem se tornarem obesos espontaneamente, alimentando-se de ração comercial, ou através de outras manipulações. Estes modelos animais são de grande valor no estudo das condições bioquímicas, fisiológicas e patológicas.

Por todo o período experimental os animais receberam ração peletizada Purina®, dieta nutricionalmente completa (Tabela 2), e água *ad libitum*, cada tratamento recebeu um tipo diferente de suplementação.



Figura 7- Ratos Wistar com 1 dia de nascimento.

Foi utilizado no modelo experimental, *Rattus Novergicus* da linhagem Wistar, para a realização do experimento, foram utilizados 100 ratos machos para a realização da indução, desses, 40 fizeram parte do tratamento (Tabela 1). Na seleção, foi realizado um pareamento dos animais em forma de Z, de modo que os diferentes grupos experimentais apresentaram pesos aproximados. Com 22 dias de idade e peso variável de 40g a 60g iniciou-se o tratamento. Os animais tiveram amostras de sangue coletadas 1 hora antes do início do tratamento, aos 14 dias após o início do experimento e ao final do tratamento para dosagem dos níveis lipídicos plasmáticos.

4.4 Indução a dislipidemia.

A indução à dislipidemia foi aplicada em 100 ratos Wistar machos, recém-nascidos oriundos do Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), que receberam glutamato monossódico (MSG - 2mg/g peso corporal) via subcutânea no dorso, a

cada dois dias, nos primeiros 14 dias de vida. Durante a indução, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas em 15 caixas plásticas (42cm x 34cm x 17cm) de 6 a 7 animais por caixa com as mães, à uma temperatura de 22° C e foto-períodos de 12 horas de claro e 12 horas de escuro.



Figura 8- Indução por via subcutânea.

4.5 Avaliação nutricional.

A massa corporal dos animais foi determinada no início e final do tratamento em uma balança de precisão onde os animais eram colocados em uma gaiola para que ficassem quietos e tarava a balança a cada animal (Modelo BK 500, TOLEDO®).



Figura 9- Balança de precisão.

4.6 Coleta de sangue.

Todos os animais tiveram amostras sanguíneas coletadas e foram feitas antes do tratamento (tempo 0), aos 14 dias (tempo 1) e finalmente, aos 28 dias (tempo 2). O sangue foi coletado por punção cardíaca, e os animais foram anestesiados com associação de cloridrato de cetamina a 5% (0,15 ml/Kg) e cloridrato de xilazina a 2% (0,015 ml/Kg), via intraperitoneal. Todo material usado nas coletas foram descartáveis, para cada amostra de 0,5ml de sangue foi utilizada uma seringa de 1ml e após coleta, foram colocado em um tubo de ensaio com heparina, permitindo a separação. O soro foi separado com pipeta, acondicionado em eppendorf e colocado em freezer a 5°C para realização das análises.

4.7 Análise do perfil lipídico.

A análise do perfil lipídico do sangue foi realizada em triplicata pelo método de teste enzimático colorimétrico com fator de “clareance” de lipídeos e usando-se método espectrofotométrico com padrão interno, em todas as amostras sanguíneas foram dosados os níveis séricos de colesterol total (CT), triglicérides (TGL) de acordo com Institute of Medicine (2005) foram quantificadas após centrifugação utilizando um analisador automático A15 (BioSystems®). As análises do material foram realizadas em triplicata no Laboratório de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas – FCF.

4.8 Protocolo da gavagem.

Foi usada com instrumento de gavagem uma sonda oral-gástrica flexível Embramed®, de 0,4mm e uma seringa de 1,0 ml. A sonda utilizada para administração de dieta enteral tem especificações técnicas de tubo em PVC atóxico, flexível transparente, superfície lisa, com

ponta arredondada fechada no lado proximal do tubo e 02 orifícios alternados em lados opostos. Sem sedação nos animais foi administrado o lipídio em sua forma líquida introduzindo a sonda pela boca cerca de 3cm de comprimento até chegar no estômago.

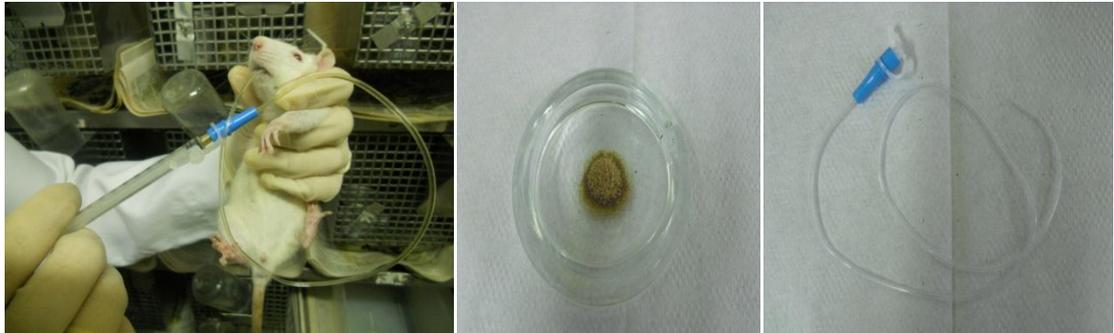


Figura 10 – Material para procedimento.

Para realização do procedimento foram separados todos os materiais a serem utilizados a fim de minimizar o duração do processo cirúrgico.



Figura 11- Anestésicos utilizados .

Os ratos foram submetidos à gavagem de 0,1 ml de azeite de oliva extra virgem ou gordura de semente de cupuaçu durante a primeira semana, a partir do 8º dia esta dosagem aumentou para 0,3 ml permanecendo até 28º dia. O horário estabelecido para a realização às oito horas (a.m.) todos os dias.

4.9 Tratamento com óleo e gordura.

Foi utilizado azeite de oliva extra virgem (Gallo®) ou gordura de semente de cupuaçu como materiais suplementares à ração. A quantidade administrada de gordura e óleo foi de 0,1ml na primeira semana e 0,3 ml no restante do experimento, os suplementos foram administrados diariamente aos animais de forma livre ou por gavagem, durante 28 dias.

A gordura de sementes de cupuaçu foi doada pela Indústria Cupuama, localizada no município do Careiro Castanho – AM, e acondicionado em vidros âmbar de 500ml.

4.10 Eutanásia dos animais.

Todos os animais ao final dos experimentos foram eutanasiados por sedação profunda utilizados associação de cloridrato de cetamina 5% e Cloridrato de xilazina 2% seguido por deslocamento cervical.



Figura 12 – Cirurgia com retirada dos órgãos.

Durante todo o processo cirúrgico eram tomados cuidados para manutenção de retirada dos órgão a fim de que os mesmos não sofressem nenhum trauma pelo processo.



Figura 13 - Fígado e coração de um Wistar com a dieta induzida.

Após a seleção, isto é, separação dos órgãos, os mesmos eram lavados com soro e secados em papel toalha apropriados para posterior armazenamento em recipientes de vidro individualizados e registrados.

4.11 Análise histológica do coração e fígado.

Análises histológicas foram realizadas com 3 animais de cada grupo escolhidos aleatoriamente. Os órgãos cardíacos e hepáticos dos animais foram lavados em água destilada, secos em papel toalha, pesadas, seccionadas transversalmente e colocados em solução de ALFAC (85ml de etanol 80%, 10ml de formol 37%, 5ml de ácido acético) por 16 horas. Após este período, os órgãos foram transferidos para uma solução de álcool a 70% e levados ao Laboratório de Histologia da UFAM onde permaneceram até preparação das lâminas histológicas (fixação e coloração).

Processou-se o tecido em soluções crescentes de álcool e xilol, que, em seguida, foi incluído em blocos de parafina (Parafina para Histologia®, Isofar, Indústria e Comércio de Produtos Químicos – Rio de Janeiro, Brasil) e cortado, com o auxílio de um micrótomo (Leica RM20225®, *Leica Instruments* – China), em fatias de 4 µm de espessura. As lâminas, preparadas a partir dessas fatias, foram submetidas a coloração de hematoxilina e eosina (HE)

e PAS, que permitiu a verificação da arquitetura histológica cardíaca e hepática. Após a coloração, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico no setor de Patologia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e fotografadas com câmera digital (Canon PowerShot A640®).

4.12 Análise centesimal da ração comercial.

Foi utilizada 3 amostras da ração comercial Purina® para a realização de análise centesimal no Laboratório de Nutrição de Peixes no INPA na Coordenação de Pesquisa em Aquicultura (CPAQ). Os resultados de umidade, fibra, proteína (N X 6,25) e carboidrato (por diferença) foram obtidos seguindo-se recomendações de Análises da AOAC (1997).

Tabela 4 – Análise centesimal da ração comercial Purina®

100g de Ração			
Caloria	409,6	Cal	
Carboidrato	284,4	Cal	71 %
Proteína	107,2	Cal	27 %
Lipídio	18	Cal	2 %
Fibra	Nd		1,4 %
Cinza matéria seca	Nd		8 %
Cinza matéria úmida	Nd		7,2 %
Umidade	Nd		10 %
Nd: Não determinado			

Fonte: Vide embalagem – adaptado.

4.13 Análise estatística.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, com repetições. As análises realizadas visaram à comparação do peso e dos níveis de CT (colesterol total) e TG (triglicerídeos) nos diferentes momentos do experimento e entre os diferentes grupos de estudo. Os dados foram expressos em médias \pm DP, o valor de *p* considerado significativo foi $< 0,05$. Os resultados dos testes foram processados através de análise de variância (ANOVA), teste de Tukey para comparação de médias entre os grupos. Para execução das análises estatísticas foi utilizado o “Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores - SANEST” (Zonta & Machado, 1984).

4.14 Preparação dos óleos e gorduras para análises.

Foram utilizados dois tipos de azeite de oliva extra virgem e dois tipos de gorduras de semente de cupuaçu produzidas em períodos diferentes.

Para a realização das análises químicas e cromatográficas foi utilizado os procedimentos do instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985; AOAC, 1995^{abc}; AOCS, 1997; ISSO, 1990).

O procedimento foi realizado no Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA, um Centro de tecnologia da Suframa, que é trabalha para desenvolver as inovação tecnológica, onde cria condições para o desenvolvimento ou aprimoramento de processos e produtos da biodiversidade amazônica, neste processo houve todo o rigor quanto as análises dos produtos.

A determinação de lipídios em alimentos foi feita pela extração contínua em aparelho do tipo Soxhlet, seguida da remoção por destilação. O resíduo obtido, constituído majoritariamente por triglicerídeos foi usado nas análises qualitativas.

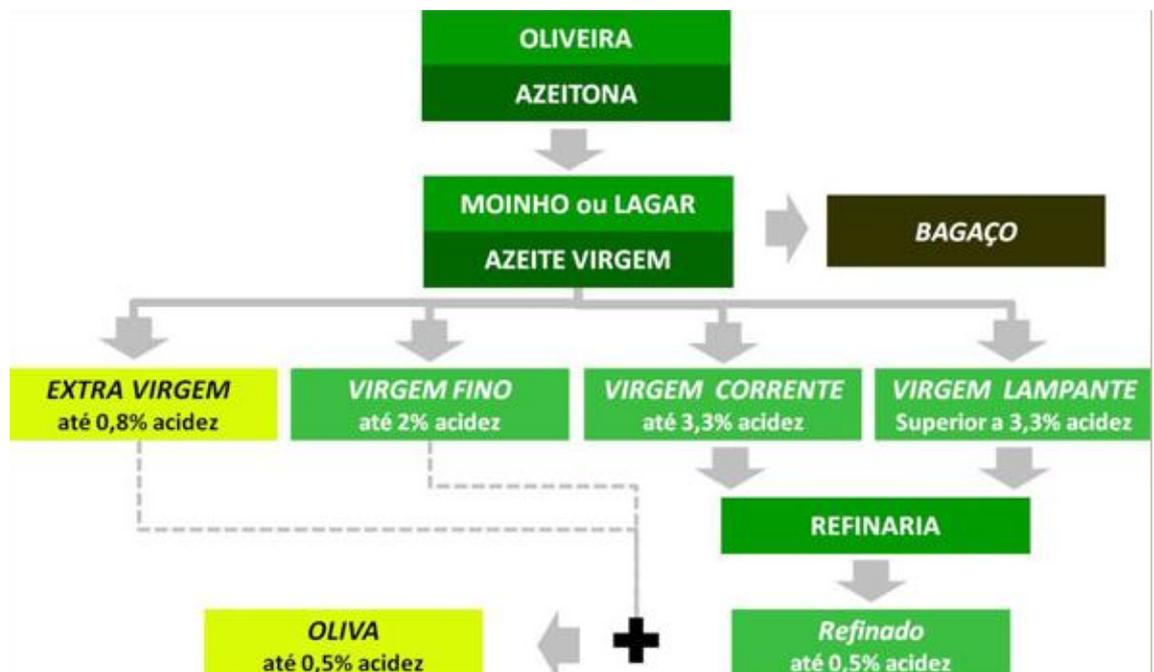


Figura 14 – Processo de extração do Azeite de Oliva
Fonte: Silva, 2012.

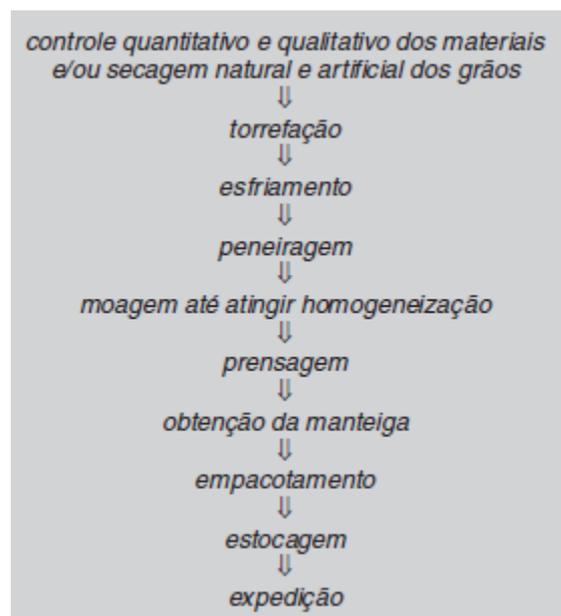


Figura 15 – Fluxograma de obtenção da gordura de cupuaçu.
Fonte: Lannes e Medeiros, 2003.

4.15 Determinação da composição dos óleos por cromatografia gasosa.

As análises de qualificação de ácidos graxos presentes em sementes de cupuaçu e azeite de oliva foram realizadas no Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA). O equipamento utilizado nas análises foi cromatógrafo a gás QP 2010 Shimadzu acoplado com espectrômetro de massa conforme método oficial da AOCS (1993). coluna fases estacionárias de ciano propil siloxano – Comprimento 30m e 0,25 μ m x 0,25mm, gás de arraste He, integrador a um computador, Os picos foram identificados através da biblioteca utilizada dos respectivos tempos de retenção. A preparação das amostras foi realizada de acordo com procedimento internos do laboratório.

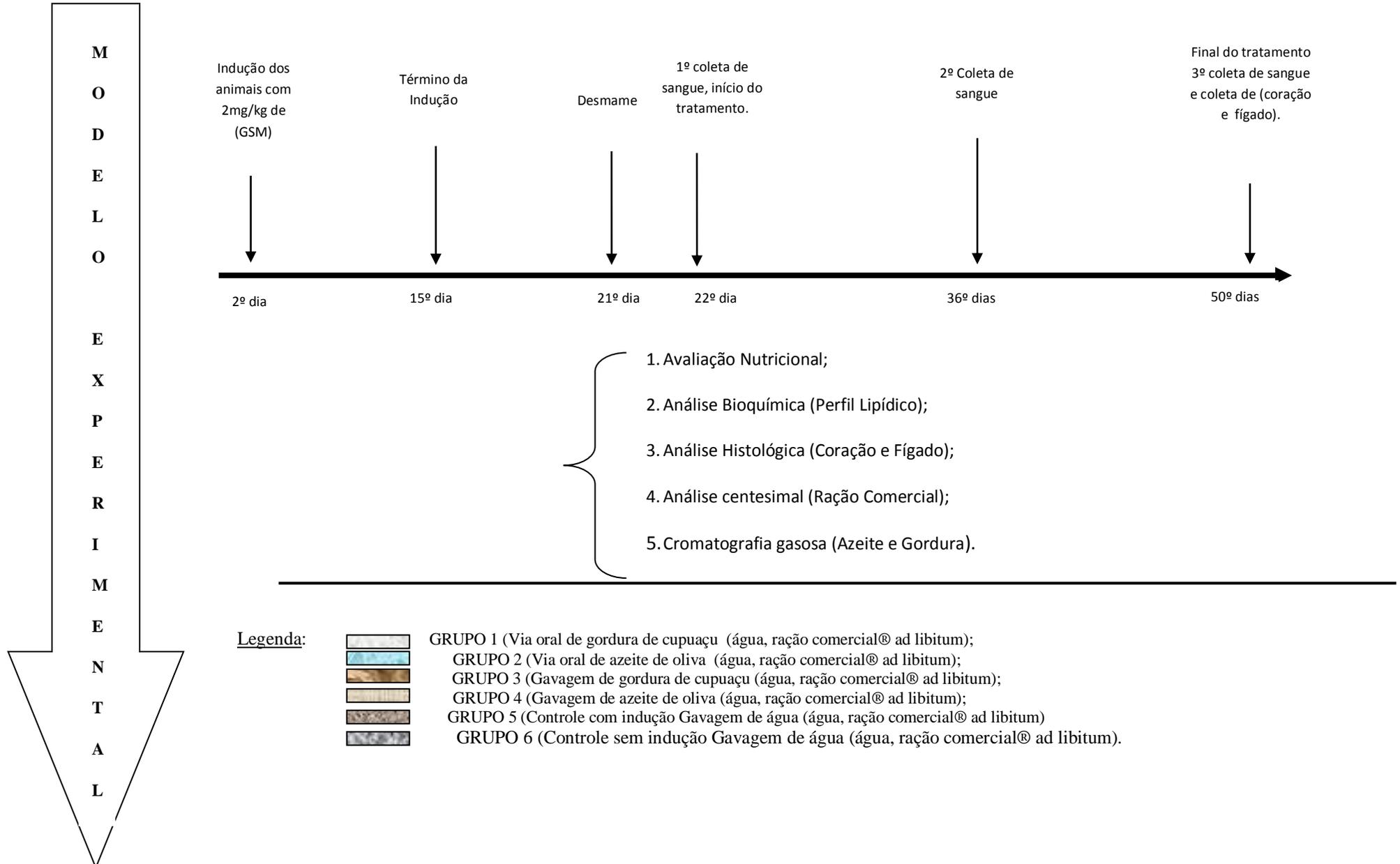
Os lipídios das amostras analisadas foram submetidos a reações de transesterificação e esterificação; os ésteres metílicos de ácidos graxos formados foram determinados por cromatografia em fase gasosa.

O método permitiu uma separação qualitativa de misturas de ésteres metílicos de ácidos graxos saturados e insaturados de acordo com IAL (1985).

Após o preparo das amostras no laboratório e com a utilização do equipamento, o processo de análise ocorreu automaticamente eliminando qualquer tipo de interferência.

5 - DELINEAMENTO DA PESQUISA

5.1 Fluxograma.



6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

6.1 Fator hipodislipidêmico.

A pesquisa deu início com a separação dos animais em grupos de semelhança no peso e foram separados em gaiolas individualizados seguindo todos os critérios do CEUA, o tratamento foi escolhido aleatoriamente entre os grupos e pode ser observado na tabela 5 abaixo descrita, onde há 6 tipos de tratamentos e dois grupos controles.



Figura 16 – Gaiola dos animais

A tabela abaixo mostra os diversos tratamentos realizados nos grupos de ratos Wistar durante a pesquisa.

Tabela 5. Tratamentos realizados com os ratos macho da linhagem Wistar.

Tratamento	Indução com GM	Suplementação (0,1ml a 0,3ml)			Ad. Libitum	
		AZ	GC	ÁGUA	RAÇÃO	ÁGUA
TMT 1	Sim		via oral		Sim	Sim
TMT 2	Sim	via oral			Sim	Sim
TMT 3	Sim		via gavagem		Sim	Sim
TMT 4	Sim	via gavagem			Sim	Sim
TMT 5	Sim			via gavagem	Sim	Sim
TMT 6	Não			via gavagem	Sim	Sim

AZ: azeite de oliva extra virgem (Gallo®), GC: gordura de semente de cupuaçu, GM: glutamato monossódico.

TMT: Tratamento

Para a verificação do aumento de massa, os animais foram pesados no tempo zero (início do tratamento) e no tempo final (ao final dos 28 dias de tratamento) e foi observado que o grupo que ganhou menos peso foi o grupo 3 gavagem de azeite de oliva extra virgem seguido por gavagem de gordura de semente de cupuaçu.

Tabela 6 - Análise de peso inicial e final dos animais

TRATAMENTO	PESO INICIAL (g)	PESO FINAL (g)
TMT 1	48,78±3,06	187,5±18,11
TMT 2	48,26±2,88	200,39±17,08
TMT 3	48,53±3,23	181,49±13,08
TMT 4	49,15±3,15	183,23±9,32
TMT 5	53,92± 0,453	185,89±23,49
TMT 6	50,49± 5,13	183,19±23,27

TMT = Tratamento.

Observa-se que no final do tratamento os grupos controles obtiveram uma maior evolução ponderal do que os grupos de tratamento de acordo com Oliveira, et al.(2005) que em sua pesquisa utilizou óleo de soja na dieta.

Na tabela 7 podemos observar que para o colesterol total os grupos 1, 2 e 3 aumentaram os níveis no primeiro momento em que estavam recebendo 0,1ml de azeite de oliva extra virgem ou gordura de semente de cupuaçu, porém quando aumentou-se a administração do lipídio para 0,3ml os níveis do colesterol baixaram. Para os triglicérides observa-se uma redução dos níveis no primeiro momento para os grupos 1, 2, 3 e 4, posteriormente no tempo 2 estes valores foram aumentando.

Tabela 7- Média do valor de colesterol e triglicerídeos.

COLESTEROL TOTAL				TRIGLICERIDEOS		
TMT	TEMPO 0	TEMPO 1	TEMPO 2	TEMPO 0	TEMPO 1	TEMPO 2
	(mg/dL)					
1	92 ± 8,29	164,9 ± 32,6	122,3 ± 19,8	142,8 ± 21,9	84,2 ± 32,8	87,8 ± 8,4
2	88,9 ± 10,23	156,7 ± 29,2	120,78 ± 22,7	141,4 ± 51,05	89,4 ± 32,5	118,2 ± 21,1
3	93,2 ± 10,2	163,5 ± 24,8	125,33 ± 21,5	133,1 ± 49,8	87,9 ± 37,9	100,6 ± 38,9
4	93,2 ± 8,7	95,2 ± 10,7	162,3 ± 20,75	107,7 ± 34,3	102,9 ± 7,5	109,3 ± 26,3
5	92,38 ± 10,38	110,5 ± 15,5	161,8 ± 26,08	96,75 ± 17,89	107,4 ± 20,1	120,8 ± 23,5
6	93,1 ± 19,3	105,3 ± 12,3	164,6 ± 28	86,43 ± 11,19	95,9 ± 9,4	127,6 ± 30,7

Tempo 0 : Antes do tratamento, **Tempo 1**: Aos 14 dias de tratamento e **Tempo 2**: Aos 28 dias de tratamento

TMT1 = Grupo com suplementação de gordura de semente cupuaçu via oral; **TMT2** = Grupo com suplementação de azeite de oliva extra virgem via oral; **TMT3** = Grupo com suplementação de gordura de semente de cupuaçu por gavagem; **TMT4** = Grupo sem suplementação e sem indução à dislipidemia (Controle 2); **TMT5** = Grupo com suplementação de azeite de oliva extra virgem por gavagem; **TMT6** = Grupo sem suplementação com indução à dislipidemia (Controle 1).

De acordo com IMEN (2012), Os benefícios do azeite já são reconhecidos mundialmente, tanto que o rigoroso FDA (Food and Drug Administration, agência que regula produtos farmacêuticos e alimentícios nos EUA) autorizou os fabricantes de azeite a fazerem referência nas embalagens sobre os efeitos benéficos para a saúde e, principalmente, para o sistema cardiovascular. Enquanto os outros óleos são produzidos a partir das sementes, o azeite é o único óleo extraído da fruta (azeitona), que possui gordura monoinsaturada (a mais saudável das gorduras) vitaminas e minerais, além de ser fonte de vitamina E e de vários compostos que são antioxidantes, Porém o presente estudo mostra que seus benefícios podem ser comparados ao da gordura de semente de cupuaçu na qual apresenta como potencial para fator hipodislipidêmico.

Podemos também observar que para os níveis sanguíneos de HDL a gordura de cupuaçu se mostrou mais eficaz quanto aos demais tratamentos, mesmo comparado ao azeite de oliva que já se faz utilização pela população, pode-se observar que foi o único tratamento que houve aumento significativo deste produto, onde é de grande importância visto que a lipoproteínas de alta densidade (HDL) em baixas dosagens constituem fatores primordiais para o desenvolvimento de doença aterosclerótica, principal causa de morte nos países industrializados (AGUIAR, 2006).

Tabela 8 – Resultado da análise de sangue para HDL nos tempos

LIPOPROTEINA DE ALTA DENSIDADE - HDL			
TMT	TEMPO 0	TEMPO 1	TEMPO 2
(mg/dL)			
1	19,4 ± 1,8	19,2 ± 2,1	22,8 ± 7,9
2	19,44 ± 2,4	19,4 ± 1,1	19,7 ± 0,7
3	19,8 ± 3,4	20,3 ± 1	18,6 ± 6,7
4	20,37 ± 3,8	18,9 ± 1,7	19,7 ± 1,4
5	19,75 ± 1,58	20 ± 1,3	19,8 ± 1,2
6	22 ± 2,8	18,6 ± 2,3	18,7 ± 1,3

Segundo Aguiar (2006) a redução de aproximadamente 30% na morbidade e na mortalidade dessa doença decorre da diminuição do colesterol ligado à LDL o que podemos observar na tabela 9 que os grupos de tratamento 4, 5 e 6 obtiveram um aumento muito significativo nos níveis desta lipoproteína, inclusive o grupo 5 que era o com tratamento de azeite de oliva extra virgem apresentou um índice elevado quando o tempo de tratamento aumentou.

Tabela 9 – Resultado da análise de sangue para LDL nos tempos

LIPOPROTEINA DE BAIXA DENSIDADE - LDL			
TMT	TEMPO 0	TEMPO 1	TEMPO 2
(mg/dL)			
1	44,1 ± 8,2	128,8 ± 34,4	81,9 ± 21,2
2	41,3 ± 11,8	119,4 ± 33,7	77,5 ± 18,9
3	47 ± 14,19	125,7 ± 30,9	74,1 ± 33
4	51,3 ± 12,6	55,7 ± 10,1	120,8 ± 23

5	53,38 ± 9,64	69 ± 14	117,9 ± 23,3
6	54,43 ± 18,02	67,5 ± 9,8	120,3 ± 24,8

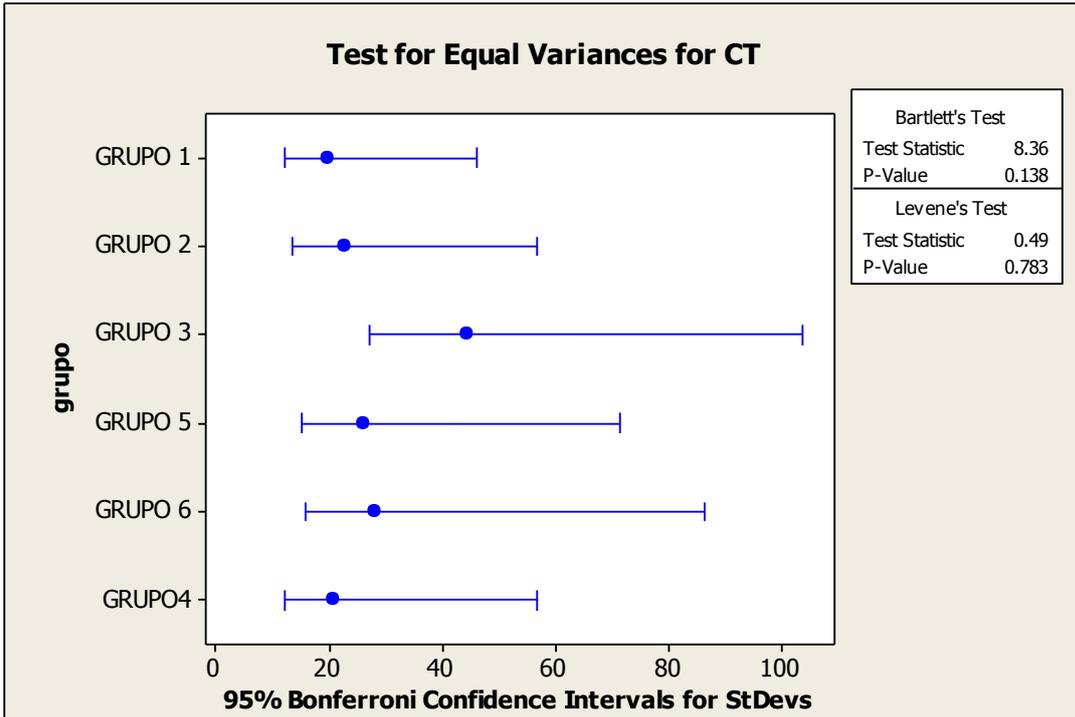
Observando a Tabela 10 há indicativo e confirmação de que a gordura de cupuaçu é benéfica para o tratamento das doenças dislipidêmicas, visto que o grupo de tratamento que mais reduziu seus níveis em relação a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) foi o grupo 1.

Tabela 10 – Resultado da análise de sangue para VLDL nos tempos

LIPOPROTEINA DE MUITO BAIXA DENSIDADE - VLDL			
TMT	TEMPO 0	TEMPO 1	TEMPO 2
	(mg/dL)		
1	28,5 ± 4,3	16,8 ± 6,6	17,7 ± 1,7
2	28,22 ± 10,15	17,9 ± 6,5	23,6 ± 4,03
3	26,6 ± 9,85	17,6 ± 7,6	20,2 ± 7,78
4	21,3 ± 6,8	20,6 ± 1,5	21,87 ± 5,08
5	19,37 ± 3,5	21,5 ± 4,0	23,87 ± 4,7
6	17,28 ± 2,21	19,2 ± 1,9	25,4 ± 6,21

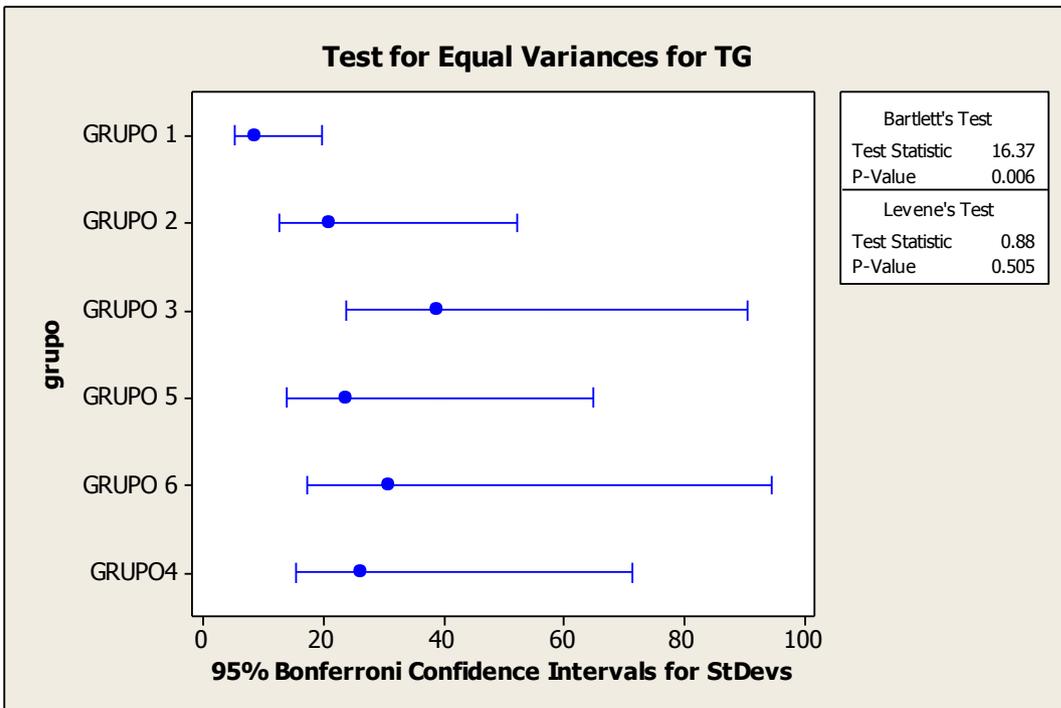
No Gráfico 2 apresenta o nível de colesterol total no tempo 3 para os grupos mostrando que os grupos 1 (suplementação de gordura de cupuaçu via oral) e 2 (suplementação de azeite de oliva extra virgem via oral) apresentaram os menores índices.

Gráfico 2 – Variância do colesterol.



No gráfico 3 observa-se que o grupo com menor nível de triglicerídeos é o grupo 1 (suplementação de gordura de cupuaçu via oral) o que demonstra ter grande efetividade no processo hipodislipidmico.

Gráfico 3 – Variância do Triglicerídeos



Segundo Neves (1997), o ácido linoléico reduz os níveis de triacilgliceróis séricos. De acordo com Morais, et al.(2003) o consumo de dieta à base de azeite de oliva a 7% em seus estudos foi a que apresentou maior redução do triacilglicerol sérico entre as fontes lipídicas estudadas.

Portanto, a gordura de semente de cupuaçu é uma fonte lipídica de grande potencial para redução de colesterol total e triglicerídeos séricos e pode ser comparada ao azeite de oliva extra virgem neste benefício apesar de serem tipos diferentes de lipídios. Sugiro um estudo mais aprofundado desta gordura.

6.2 Análise histológica

O fígado possui uma das mais altas atividades de enzimas antioxidantes e está envolvido na maioria das desintoxicações do organismo, ele é importante na degradação e bioativação dos compostos tóxicos do organismo. É o órgão no qual os nutrientes absorvidos no trato digestivo são processados e armazenados para utilização de outros órgãos, Sendo assim nesta pesquisa observa-se que no quadro 2 não há alterações nas lamínas do fígado do tratamento 1 que é o grupo de gordura de cupuaçu e nem no grupo controle.

FÍGADO		
	Coloração H.E.	Coloração P.A.S.
TMT 1	Não há alterações	Moderada infiltração
TMT 2	Discreta vacularização	Acentuada infiltração
TMT 3	Discreta vacularização	Acentuada infiltração
TMT 4	Não há alterações	Acentuada infiltração
TMT 5	Discreta vacularização	Acentuada infiltração
TMT 6	Discreta vacularização	Acentuada infiltração

TMT1: Via oral cupuaçu; TMT2: Via oral Azeite; TMT3: Gavagem de cupuaçu; TMT4: Controle sem indução; TMT5: Gavagem de Azeite; TMT6: Controle com indução.

Quadro 2 – Resultado das lâminas histológicas do fígado.

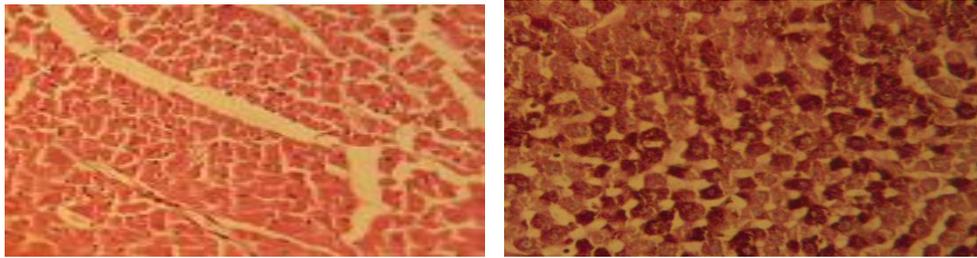


Figura 17- Histologia hepática

1

2

Segundo Leite (2004) O sistema circulatório é base para a manutenção da vitalidade tecidual de todo o organismo ao promover sua irrigação e drenagem. Como órgão central deste sistema está o coração, o qual tem sido objeto de estudo há muito tempo, descobriu-se, entre outras coisas, que suas paredes apresentam-se constituídas por três túnicas: a interna, o endocárdio; a média, o miocárdio; e a externa, o pericárdio; e ainda, possui uma porção central fibrosa que serve de ponto de apoio às válvulas e fibras musculares cardíacas chamadas esqueleto fibroso do coração, no entanto o grupo que apresentou um maior quantitativo de acúmulo de gordura cardíaca foi o grupo 1 o que demonstra no quadro 3.

CORAÇÃO		
	Coloração H.E.	Coloração P.A.S.
TMT 1	Discreto acúmulo de gordura.	Moderada infiltração
TMT 2	Não há alterações	Moderada infiltração
TMT 3	Não há alterações	Discreta infiltração
TMT 4	Não há alterações	Moderada infiltração
TMT 5	Não há alterações	Moderada infiltração
TMT 6	Não há alterações	Discreta infiltração

TMT1: Via oral cupuaçu; TMT2: Via oral Azeite; TMT3: Gavagem de cupuaçu; TMT4: Controle sem indução; TMT5: Gavagem de Azeite; TMT6: Controle com indução.

Quadro 3 – Resultado das lâminas histológicas do coração.

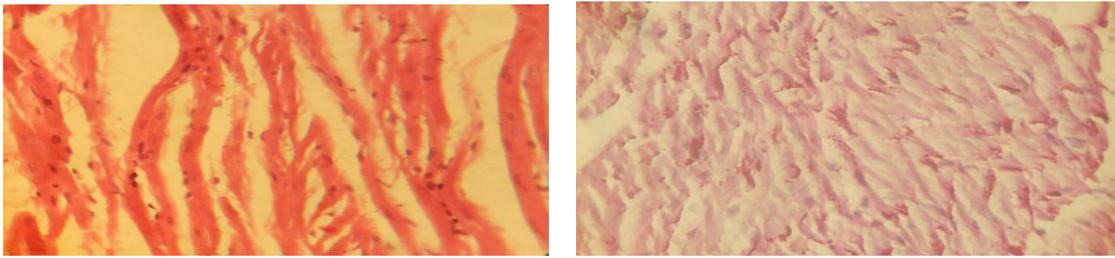


Figura 18 - Histologia Cardíaca 1

2

6.3 Análise e Cromatografia

Os índices analíticos físico-químicos verificados em azeite de oliva extra virgem e gordura de sementes de cupuaçu encontram-se na Tabela 11.

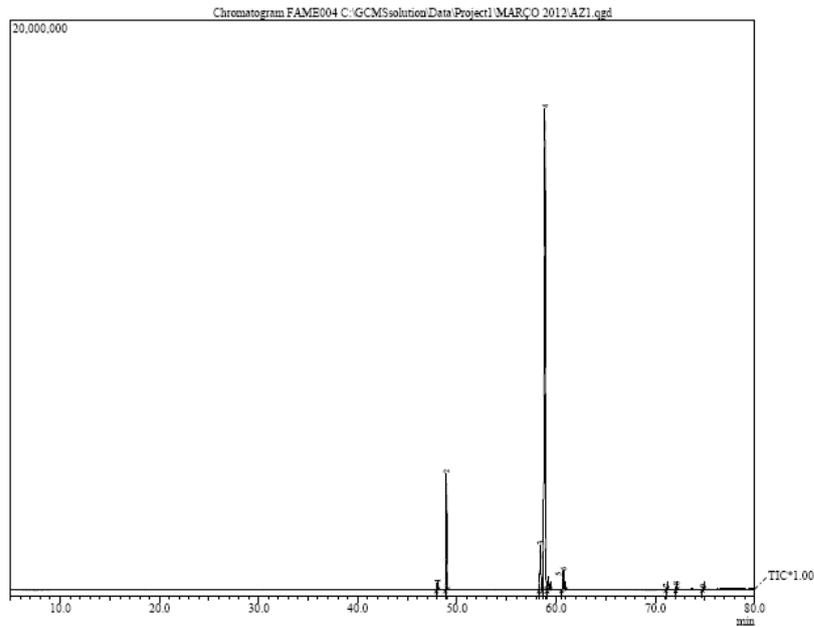
Tabela 11 - Análise química dos azeites e gordura de cupuaçu

Índices	Valor de referência			
	AZ1	AZ2	GC1	GC2
Saponificação (mg de KOH/100g)	194,1± 2,6	192,5±3,1	187±1,5	184,5±2,9
Insaponificação (gordura total - gordura saponificável)	0,37±0,03	0,75±0,4	0,13±0,02	0,26±0,1
Acidez % (mg de ácido oleico/100g de gordura)	0,6±0,1	0,5±0,15	1,9±0,8	2,4±0,45
Peróxido (meqgO ₂ /Kg)	9,7±1,1	9,6±1,7	11,8±0,8	13,8±0,3
Ácidos Graxos Livres %	8,32±1,4	nd	27±1,8	nd
AZ1 = Azeite de oliva extra virgem (Gallo®);				
AZ2 = Azeite de oliva extra virgem (Andorinha®);				
GC1 = Gordura de cupuaçu fabricação Agosto de 2010;				
GC2 = Gordura de cupuaçu fabricação Novembro de 2011.				

Observa-se que os azeites possuem um maior valor que a gordura de cupuaçu e de acordo com Oliveira (2006) a saponificação, ou hidrólise alcalina é uma reação entre óleos e álcalis e sob pressão e aquecimento moderado origina além do glicerol, ácidos graxos na forma de sabões (sais alcalinos). O índice de insaponificação é a medida dos constituintes de gordura, que não possuem radicais livres, incluindo o colesterol. A determinação do índice de acidez indica a conservação dos alimentos, quando o produto está sofrendo processo de hidrólise, oxidação ou fermentação, tornando o processo mais ácido, justamente pela liberação de íons de hidrogênio (MORETTO & FETT, 1998), na Tabela 8 mostra que os índices de acidez dos azeites estão em torno de 0,5 e que o da gordura de cupuaçu tem média de 2,15 expressa em gramas de ácido oleico. Tendo em vista como valor máximo de referencia 10meq/kg para índices de peróxido estabelecido pela ANVISA para óleos comerciais (BRASIL, 1998) os azeites encontram-se de acordo com a legislação, porem a gordura de cupuaçu possui seu índice acima da normalidade que segundo Bognár (1998) teores elevados de índice de peróxido caracterizam a perda de qualidade. Em relação aos ácidos graxos livres pode-se observar na tabela acima que o azeite de oliva apresenta índice menor que o da gordura de cupuaçu que é de 27%.

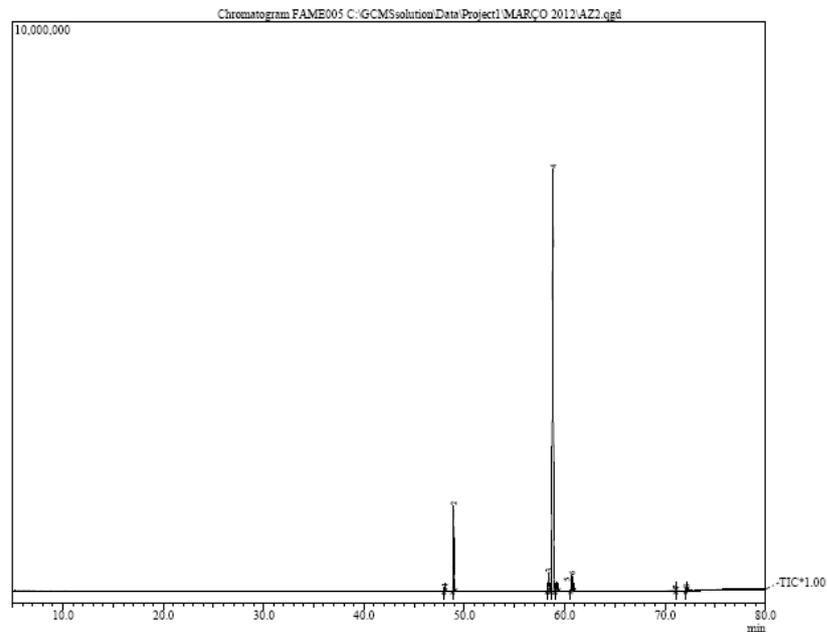
Portanto, a análise cromatográfica de azeite de oliva extra virgem (Gallo®), revelou a presença de três ácidos graxos principais: Oleico C18:1 (pico 4 com tempo de retenção 58,86min.), linoleico C18:2 (pico 6 com tempo de retenção 60,73min.) e palmítico C16:0 (pico 2 com tempo de retenção 48,94min.).

Gráfico 4 – Cromatografia do Azeite Gallo®.



A Cromatografia da amostra AZ2 azeite de oliva extra virgem (Andorinha®) revelou sua composição peculiar, evidenciando principalmente o ácido graxo oléico C18:1 (aparecendo no pico 4 no tempo 58,83min.) e confirmado pelo espectro de massas com suas características habituais de fragmentos massa-carga. Além disso, o ácido linoléico C18:2 (pico 6 no tempo 60,73min.) e palmítico C16:0 (pico 2 no tempo 48,94min.) caracterizam a presença majoritária de gorduras insaturadas (C18:1 e C18:2) como também de gorduras saturadas (C16:0).

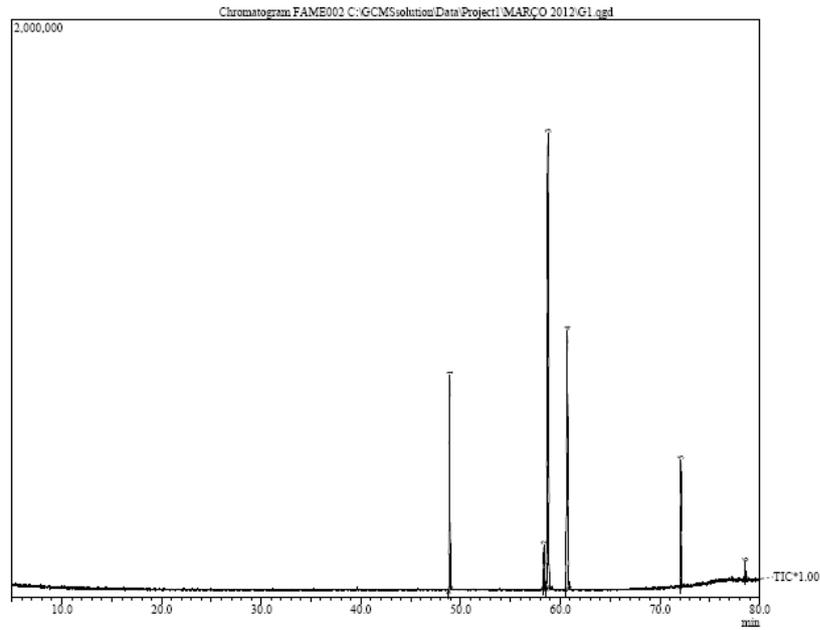
Gráfico 5 – Cromatografia do Azeite andorinha®.



O cromatograma da gordura de semente de cupuaçu GC1 (Fabricação em agosto de 2010) revela no pico 3 o mesmo tempo de retenção de 58,76min do pico 4 do AZ1 (azeite Gallo®) 58,87min, caracterizando o ácido oleico C18:1, também como ácido predominante. Da mesma forma identificou-se o ácido linoleico C18:2 com tempo de retenção de 60,70min. o pico 6 do AZ1 com tempo de 60,74min. evidenciado pelos espectros de massas, caracterizando o ácido graxo linoléico C18:2 com maior abundância, isto pode ser considerado como um indicador de maior atividade da gordura de cupuaçu na hipodislipidemia. o pico 5 se refere ao ácido araquídico C20:0, o que pode conferir o equilíbrio entre as gorduras insaturadas e saturadas.

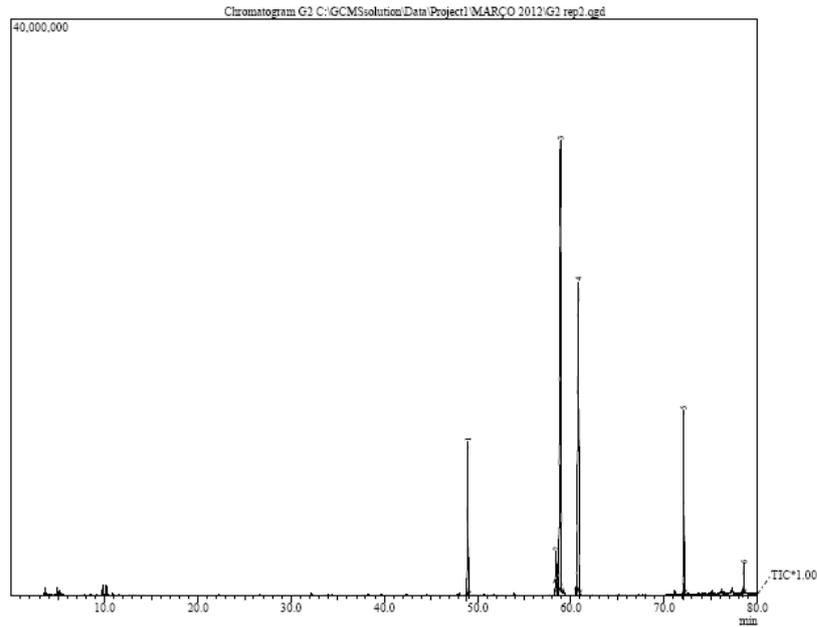
Nas análises verificou-se a presença de oleico, linoleico e araquídico. Entretanto observa-se que a quantidade de ácido oleico é maior no azeite de oliva, porém na gordura de cupuaçu existe uma correlação quantitativa entre o ácido oleico e o ácido linoleico e a identificação do ácido araquídico é muito maior na gordura de cupuaçu.

Gráfico 6 – Cromatografia da gordura de cupuaçu de 2010.



Na cromatografia gasosa GC2 gordura de semente de cupuaçu (Fabricação em novembro de 2011) o pico 3 aparece no tempo de retenção de 58,89min., o que pode caracterizar a presença majoritária do ácido oléico C18:1. Já o pico 4 apresenta tempo de retenção de 60,81min. demonstrando uma relação entre esses dois picos que é evidenciado pelos espectros de massas. Caracterizando o ácido graxo linoléico C18:2 com maior abundância. Esta correlação entre o ácido oléico e o linoléico que é mais evidenciada na gordura de cupuaçu, é considerada como um indicador de maior atividade na hipodislipidemia. O pico 5 se refere ao ácido araquídico C20:0, o que pode conferir o equilíbrio entre as gorduras insaturadas e saturadas.

Gráfico 7 – Cromatografia da gordura de cupuaçu de 2011.



Os resultados acima expostos confirmam o relato de Saraiva (2008) que na gordura de cupuaçu, o íon de m/z 633 é um fragmento com fórmula molecular $[C_{41}H_{77}O_4]^+$ proveniente da dissociação de um triglicerídeo de massa molecular superior, contendo em sua estrutura uma unidade de ácido araquídico e oleico, enquanto o íon de m/z 635, também é um fragmento que contém uma unidade de ácido araquídico e esteárico e de fórmula molecular $[C_{41}H_{79}O_4]^+$. Portanto a gordura de cupuaçu é formada principalmente por TAGs de ácidos graxos saturados, o que podemos confirmar através da análise cromatográfica.

CONCLUSÃO

Com tudo podemos observar que o ácido linoléico reduz os níveis de triacilgliceróis séricos e que o consumo de dieta à base de azeite de oliva a 7% em seus apresenta uma redução do triacilglicerol sérico porem não consegue superar a ação hipodislipidêmica da gordura de semente de cupuaçu.

Sendo assim a gordura de semente de cupuaçu e o azeite de oliva extra virgem possuem constituição químicas semelhantes, porém em quantidades diferente, o que pode ser um indicativo para a melhora dos índices lipídicos sanguíneos, trata-se de uma fonte lipídica de grande potencial para redução de colesterol total e triglicerídeos séricos e pode ser comparada ao azeite de oliva extra virgem neste benefício apesar de serem tipos diferentes de lipídios. Sugiro um estudo mais aprofundado desta gordura.

Portanto, a gordura de semente de cupuaçu tem potencial para redução de colesterol total e triglicerídeos séricos e pode ser comparada ao azeite de oliva extra virgem neste benefício apesar de serem tipos diferentes de lipídios. A correlação entre o ácido oléico ω -9 (18:1) e o ácido linoléico ω -6 (18:2) é mais evidenciada na gordura de cupuaçu e pode ser considerada como um indicador de maior atividade na hipodislipidemia.

A gordura de semente de cupuaçu e o azeite de oliva extra virgem possuem constituição químicas semelhantes, porém em quantidades diferente, o que pode ser um indicativo para a melhora dos índices lipídicos sanguíneos.

REFERÊNCIAS

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4th ed. Champaign, USA: A.O.C.S., 1990.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4th ed. Champaign, USA: A.O.C.S., 1995. (A.O.C.S. Official Method Ce 2-66: Preparation of methyl esters of long chain fatty acids).

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4th ed. Champaign, USA: A.O.C.S., 1995. (A.O.C.S. Official Method Ce 1d-91 Determination of fatty acids in edible oils and fats by capillary GLC).

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4th ed. Champaign, USA: A.O.C.S., 1997. (A.O.C.S. Official Method Ce 1f-96 Determination of *cis* and *trans* fatty acids in hydrogenated and refined oils and fats by capillary GLC).

ASSOCIATION OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. 1997. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16.ed. Maryland: [s.ed., s.d.]

BACHUR, C.K.; BACHUR, J.A.; VEIGA, E.V.; NOGUEIRA, M.S. 2009. Suplementação dietética com resveratrol na promoção da saúde: uma revisão sistemática. **Revista de Nutrição**. v.24, n.1, p.23-28.

BOGNÁR, A. Estudio comparativo de la influencia de la fritura y otras técnicas de cocinado em el valor nutritivo. **Instituto de La Grasa (CSIC)**, Sevilla, v.49, 1998.

BRASIL. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. **Secretaria de Vigilância Sanitária aprova Regulamento Técnico**: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos". Diário Oficial, Brasília, 24 set. 1998, Seção 1.

BRASIL. 2009. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Indicadores de Vigilância Alimentar e Nutricional**: Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. 2000. **Bioquímica ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, s.d.

FROEHNER S.; LEITHOLD J.; LIMA JÚNIOR L.F. Transesterificação de óleos vegetais: caracterização por cromatografia em camada delgada e densidade. **Quím. Nova** vol.30, São Paulo: 2007.

HUANG, CL.; SUMPIO, B., **Mediterranean diet and cardiovascular health** J. Am. Coll. Sug. , 2008.

IMeN – Instituto de Metabolismo e Nutrição – www.nutricaoclinica.com.br acessado em 26/07/2012.

INSTITUTE of Medicine of the National Academies. **Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids**. Washington, DC: The National Academies Press, 2005.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids**. Washington: National Academy, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1 Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos, 3. ed. Sao Paulo: IMESP, 1985.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO 5508**: Animal and vegetable fats and oils – Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids. ISSO 5508, 1990.

LEVY-COSTA, R.B.; SICHIERI,R.; PONTES, N,S.; MONTEIRO, C.A. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução(1974-2003). **Revista de Saúde Pública**. v.39, n.4. 2005.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. 1998. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9. ed. São Paulo: Roca, [s.d.].

MORAIS, C.S.N.U; BARCELOS, M.F.P.; SOUSA, R.V.; LIMA, H.M.; LIMA A.L. Efeito das fontes e níveis de lipídios nas dietas de ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) sobre frações lipídicas do sangue. **Ciênc. agrotec.**, Lavras. V.27, n.5, p.1082-1088., 2003.

MORETTO, E.; FETT, R., **Tecnologia de óleo vegetais e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1998.

NEVES, N. M. S. 1997. **Nutrição e doença cardiovascular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, [s.d.].

OFFICIAL Methods of Analysis – AOAC: Standard solutions and reference materials, 2000. Appendix A.

OLIVEIRA, Admar Costa de et al. O uso do destilado da desodorização do óleo de soja como fonte alternativa de vitamina E reduziu a evolução ponderal em ratos. **Rev. Nutr. [online]**, vol.18, n.5, pp. 693-697. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732005000500012>. acessado em: 2005.

OLIVEIRA, JA; LUZ, JAM; FERREIRA, EE., Grau de saponificação de óleos vegetais na flotação seletiva de apatita de minério carbonatítico. **Rem: Rev. Esc. Minas**, v. 59, n. 4, Dec. Ouro Preto: [s.ed.], 2006.

ORTEGA, RM; PALENCIA, A; LOPEZ-SOBALER, AM., Improvement of cholesterol levels and reduction of cardiovascular risk via the consumption of phytosterols. **British Journal of Nutrition**, 2006.

OWEN, R. W.; GIACOSA, A.; HULL, W. E.; HAUBNER, R.; WURTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. **Olive-oil consumption and health**: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol.* 2000.

PEREIRA, L.O.; FRANCISCHI, R. P. ; LANCHETA JR., Antonio H.. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab [online]**, vol.47, n.2, pp. 111-127. 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302003000200003>.

SOCIEDADE de Cardiologia do Estado de São Paulo. Acesso em: 10/05/2012. www.soces.org.br

VOLP, A.C.P.; RENHE, I.R.T.; BARRE.; STRINGUETHA, P.C. 2009. Pigmentos naturais bioativos. **Revista de Nutrição**. v.20, n.1, p.157-166. [s.l.: s. ed., s.d.]

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. 1984. **Sistema de análise estatística para microcomputadores-SANEST**. Ilha Solteira: UNESP, 109p. [s.l.: s. ed., s.d.]

APÊNDICES

APÊNDICE 2 – Orçamento detalhado

MATERIAL PERMANENTE				
ÍTEM	ESPECIFICAÇÃO	QUANTIDADE	R\$ UNITÁRIO	R\$ TOTAL
1	Tesoura de corte cirúrgica	2 unidade	22,00	44,00
2	Pinça inox cirúrgica	2 unidade	16,00	32,00
3	Tesoura cirúrgica sem corte	1 unidade	18,00	36,00
4	Becker 100ml	2 unidade	12,00	24,00
5	Becker 200 ml	2 unidade	16,00	32,00
TOTAL				R\$ 168,00

MATERIAL DE EXPEDIENTE				
ÍTEM	ESPECIFICAÇÃO	QUANTIDADE	R\$ UNITÁRIO	R\$ TOTAL
1	Papel ofício A4	3 resmas	19,00	57,00
2	Caneta (azul, preta e vermelha)	6 unidade	1,20	7,20
3	Caneta permanente (vermelha, azul e preta)	6 unidade	3,50	21,00
4	Cartucho de impressão HP energy star (preto)	2 unidade	56,00	112,00
5	Cartucho de impressão HP energy star (colorido)	2 unidade	64,00	128,00
6	Livro ata	2 unidade	12,00	24,00
TOTAL				R\$ 349,20

MATERIAL DESCARTÁVEL				
ÍTEM	ESPECIFICAÇÃO	QUANTIDADE	R\$ UNITÁRIO	R\$ TOTAL
1	Luva descartável	4 caixa	25,00	100,00
2	Mascara	1 pacote	19,00	19,00
3	Touca	1 pacote	22,00	22,00
4	Seringa de descartável 1 ml	200 unidade	0,60	120,00
5	Bisturi	50 Unidade	0,75	37,50
6	Depósitos estéreis 50ml	120 Unidade	3,20	384,00
7	Tubos valutainer para coleta 4ml	200 Unidade	0,75	150,00
8	Eppendorfs 2 a 3 ml	200 unidade	0,05	10,00
9	Ponteira de pipeta	200 unidade	0,35	70,00
10	Espátula descartável	20 unidades	0,12	2,40
11	Sonda nasogástrica 0,4 flexível	150 unidade	0,62	93,00
12	Gase estéril	12 pacotes	2,55	30,60
13	Algodão 200g	2 pacotes	3,50	7,00
14	Papel toalha com 2 unid.	1 pacote	4,50	4,50
15	Papel alumínio	1 rolo	3,50	3,50
16	Kit análise HDL	2 caixas	135,00	270,00
17	Kit análise colesterol total	2 caixas	75,00	150,00
18	Kit análise Triglicerídeos	2 caixas	110,00	220,00
19	Kit de análise TGO	1 caixa	98,00	98,00
20	Kit de análise TGP	1 caixa	112,00	112,00
TOTAL				R\$ 1903,50

MATERIAL DE CONSUMO				
ÍTEM	ESPECIFICAÇÃO	QUANTIDADE	R\$ UNITÁRIO	R\$ TOTAL
1	Etanol a 99,8% garrafa de 3L	4 unidades	26,00	104,00
2	Xilol	4 litros	32,00	128,00
3	Formol puro garrafa de 3L	1 unidade	54,00	54,00
4	Ácido acético garrafa de 3L	1 unidades	48,00	48,00
5	Paraplast plus	3 kg	84,00	252,00
TOTAL				R\$ 586,00

MATERIAL PERMANENTE	168,00
MATERIAL DE EXPEDIENTE	349,20
MATERIAL DESCARTÁVEL	1903,50
MATERIAL DE CONSUMO	586,00
TOTAL GERAL	R\$ 3.006,70

APÊNDICE 3 – Equipe Científica.

NOME	FORMAÇÃO	TÍTULO	ORGÃO	ATIVIDADE
José Merched Charar	Farmacêutico	Phd	UFAM	Orientação
Lúcia K.O. Yuyama	Nutricionista	Dr ^a	INPA	Co-orientação
Jamal Charar	Químico	Dr.	UFAM	Co-orientação
Silmara C. Pimentel	Nutricionista	Mestranda	UFAM	Execução da pesq
Risonilce F.S. Souza	Zootecnista	Graduação	INPA	Bioterista
Cynthia Costa Pinto	Farmacêutica	Mestre	INPA	Técnica de lab.
Milena C. Miranda	Agronomia	Graduação	INPA	Técnica de lab.

APÊNDICE 4 – Fotos.

O experimento foi conduzido no Biotério Central do INPA



Foto 1 – Com 1 dia de nascimento



Foto 2 – Com 14 dias de nascimento

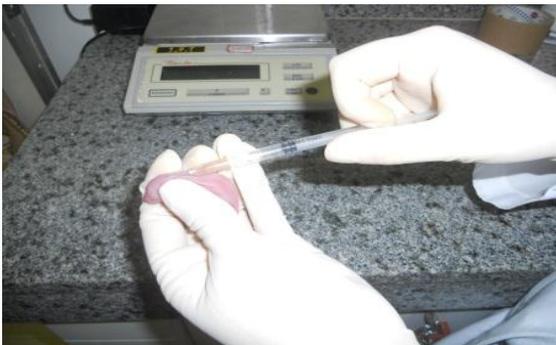


Foto 3 e 4 – Aplicação de glutamato no dorso do animal.

Para a execução da pesquisa os ratos foram submetidos à gavagem de 0,1 ml de azeite de oliva extra virgem ou gordura de semente de cupuaçu durante a primeira semana, a partir do 8º dia esta dosagem aumentou para 0,3 ml permanecendo até 28º dia. O horário estabelecido para a realização às oito horas (a.m.) todos os dias.