

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

POTENCIAL LIPÍDICO DE JACARÉS DA AMAZÔNIA COMO
MATÉRIA-PRIMA PARA NUTRACÊUTICOS

SAMIR DE CARVALHO BUZAGLO PINTO

MANAUS-AM
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

SAMIR DE CARVALHO BUZAGLO PINTO

POTENCIAL LIPÍDICO DE JACARÉS DA AMAZÔNIA COMO
MATÉRIA-PRIMA PARA NUTRACÊUTICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Ariane Mendonça Kluczkovski

MANAUS-AM
2019

Ficha Catalográfica

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

P659p Pinto, Samir de Carvalho Buzaglo
Potencial lipídico de jacarés da Amazônia como matéria-prima para nutracêuticos / Samir de Carvalho Buzaglo Pinto. 2019
81 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Ariane Mendonça Kluczkovski
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. jacaré-açu. 2. lipídeos. 3. anti-inflamatório. 4. mn. 5. hplc-apci-
ms. I. Kluczkovski, Ariane Mendonça II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

**"Potencial lipídico de jacarés da Amazônia como matéria-prima para
nutracêuticos"**

DISCENTE: SAMIR DE CARVALHO BUZAGLO PINTO

PARECER:

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 22/08/2019.



Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coordenador do PPGCF

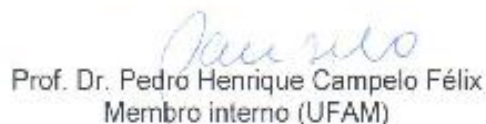
**A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes
professores:**



Prof.ª. Dr.ª. Ariane Mendonça Kluczkovski
Orientadora e presidente da banca



Prof.ª. Dr.ª. Ormezinda Celeste Cristo
Membro externo (FIOCRUZ)



Prof. Dr. Pedro Henrique Campelo Félix
Membro interno (UFAM)

À minha mãe, meu irmão
e meus amigos, pelo apoio
e incentivo para realização
deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, a Deus, pela vida que me foi dada.

A minha mãe, Sônia Carvalho, por ser aquela que me guiou por toda a minha vida, sendo grande fonte de inspiração para mim.

Ao meu irmão, Felipe de Carvalho, que sempre tinha algo para discutir e conversar, aliviando a carga de cansaço e estresse após um dia pesado de estudos.

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Ariane Mendonça Kluczkovski, por ter me dado a chance de realizar este trabalho e pela confiança depositada em mim.

Ao laboratório BIOPHAR, em especial ao Prof.^o Dr.^o Emerson Lima, à doutoranda Márcia de Jesus, e à mestranda Bárbara Janaína, e ao laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, da Central Analítica da Ufam, em especial ao Prof.^o Dr.^o Marcos Machado e ao Me. Kidney Gomes pela ajuda na realização de alguns testes.

Aos membros do NECTA, companheiros de laboratório, pelas conversas, comemorações e apoio.

A minha namorada, Janaína Barroncas, e aos meus amigos Cibele Viana, Kamilla Sousa, Sayuri Miki e Guilherme Bindá, por todo o apoio, paciência e bons momentos, pois mesmo o mais cansativo dos desafios se torna mais leve quando estamos com aqueles que nos fazem bem.

A todos vocês, muito obrigado.

RESUMO

Os óleos de origem animal vêm sendo material de estudo quanto a utilidade destes na área farmacológica e nutricional, analisando as possíveis ações, efeitos e benefícios quanto a seu uso. Estes óleos são compostos por ácidos graxos e glicerol, sendo alguns destes chamados de essenciais, aqueles não produzidos pelo organismo, mas que devem ser ingeridos para que este mantenha seu bom funcionamento. Alguns destes, os chamados ômega 3 e ômega 6, possuem diversas ações no corpo, e são objeto de estudos de nutricionistas e profissionais da saúde devido às importantes funções por eles exercidas. Estes ácidos graxos podem ser encontrados por exemplo, em peixes, aves, e até répteis. Destes répteis, os jacarés são abundantes na Região Amazônica, que se alimentam de outros peixes e moluscos e despertam interesse comercial devido à sua carne, couro e também, sua gordura. Estudos realizados com óleos de espécies animais indicam que estes podem ter ação antibacteriana, antifúngica, antioxidante e anti-inflamatória, dando a eles relevância na área da saúde e também na área nutricional. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de óleo de jacaré-açu (*Melanosuchus niger*) quanto às ações mencionadas anteriormente, além de caracterizar o óleo no que diz respeito ao índice de acidez e de peróxidos durante 90 dias, em 3 ambientes diferentes (geladeira a 8°C, ambiente a 25°C, e estufa a 45°C), bem como analisar via RMN e HPLC-APCI-MS a sua composição lipídica. Os testes de atividade antifúngica e antibacteriana foram feitos utilizando método de disco difusão em meio de cultura, utilizando respectivamente, cepa de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*. O teste de ação antioxidante foi realizado primeiro com teste de citotoxicidade pelo método Alamar Blue e ação de inibição de produção de ROS em fibroblastos MRC-5. O teste de ação anti-inflamatória foi realizado com teste de citotoxicidade pelo método MTT e ação de inibição de produção de NO em macrófagos. Os índices de acidez observados foram de valores de 6,4 mg KOH/g, considerados altos em comparação com resultados obtidos em outras pesquisas, e o de peróxidos também se apresentaram altos, 24,42 mEq/Kg no primeiro dia de teste, indicativo de degradação do óleo durante o transporte. O perfil lipídico observado nos testes indicou que o óleo era composto principalmente por ácido linoleico, linolênico, oleico, palmítico e esteárico, em diferentes combinações formando 16 tipos de triacilgliceróis e seus isômeros. O óleo não apresentou ação antioxidante, antifúngica, nem antibacteriana, porém a cepa para teste antibacteriano apresentou resistência frente a alguns antibióticos então suspeita-se que esta resistência possa ter influenciado no resultado obtido. Apesar do óleo não ter apresentado ação anti-inflamatória no teste realizado, outros autores apontam que o óleo de *Melanosuchus niger* possui de fato ação anti-inflamatória, porém por outra via de inflamação. Desta forma, os resultados obtidos neste teste, ao serem comparados com outros resultados de outras pesquisas, podem indicar que o óleo de jacaré-açu interfira com a ação da COX-2, daí seu potencial anti-inflamatório. Novos testes devem ser realizados, no que diz respeito ao potencial anti-inflamatório, em modelos *in vivo* para melhor elucidação do mecanismo de ação deste material, o que pode abrir portas para criação de novos produtos.

Palavras-chave: **jacaré-açu, lipídeos, anti-inflamatório, RMN, HPLC-APCI-MS.**

ABSTRACT

The oils of animal origin have been a study material regarding their usefulness in the pharmacological and nutritional area, analyzing the possible actions, effects and benefits regarding their use. These oils are composed of fatty acids and glycerol, some of which are called essential, those not produced by the body, but which must be ingested to maintain its proper functioning. Some of these, the so-called omega 3 and omega 6, have various actions in the body, and are the subject of studies by nutritionists and health professionals because of their important functions. These fatty acids can be found for example in fish, birds, and even reptiles. Of these reptiles, alligators are abundant in the Amazon Region, which feed on other fish and shellfish and arouse commercial interest due to their meat, leather and also their fat. Studies conducted with oils of animal species indicate that they may have antibacterial, antifungal, antioxidant and anti-inflammatory action, giving them relevance in health and also in the nutritional area. Therefore, the objective of this work was to evaluate the potential of alligator oil (*Melanosuchus niger*) in relation to the actions mentioned above, and to characterize the oil with regard to acidity and peroxide index during 90 days in 3 different environments (refrigerator at 8°C, room temperature at 25°C, and oven at 45°C), as well as to analyze through lipid NMR and HPLC-APCI-MS. Antifungal and antibacterial activity tests were performed using disc diffusion method in culture medium using *Candida albicans* strain and *Staphylococcus aureus*, respectively. The antioxidant action test was performed first with Alamar Blue cytotoxicity test and ROS inhibition action on MRC-5 fibroblasts. The anti-inflammatory action test was performed with MTT cytotoxicity test and inhibition of NO production in macrophages. The acidity rates observed were 6.4 mg KOH / g, considered high compared to results obtained in other studies, and the peroxides were also high, 24.42 mEq / kg on the first day of the test, indicative. oil degradation during transport. The lipid profile observed in the tests indicated that the oil was composed mainly of linoleic, linolenic, oleic, palmitic and stearic acid, in different combinations forming 16 types of triacylglycerols and their isomers. The oil showed no antioxidant, antifungal or antibacterial action, but the strain for antibacterial test showed resistance to some antibiotics so it is suspected that this resistance may have influenced the result. Although the oil did not show anti-inflammatory action in the test performed, other authors point out that *Melanosuchus niger* oil does have anti-inflammatory action, but by other means of inflammation. Thus, the results obtained in this test, when compared with other research results, may indicate that alligator oil interferes with the action of COX-2, hence its anti-inflammatory potential. New tests should be performed, regarding the anti-inflammatory potential, in *in vivo* models to better elucidate the mechanism of action of this material, which may open doors for the creation of new products.

Keywords: black caiman, lipids, antiinflammatory, NMR, HPLC-APCI-MS.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1- Estrutura dos ácidos graxos linolênico, linoléico e oléico.....	15
Figura 2- Uso de ômega 3 (ácido eicosapentaenóico) e ômega 6 (ácido araquidônico) no organismo.....	19
Figura 3- Cápsulas de óleo de peixe, utilizadas como suplementos.....	23
Figura 4- Jacaré-açu.....	25
Figura 5- Spin do átomo de hidrogênio.....	31
Figura 6- Ação de antioxidante sobre radical livre.....	35
Figura 7- Exemplo de composto fenólico.....	37
Figura 8- Óleo de jacaré no início dos testes, e após 90 dias, em ambientes diferentes.....	48
Figura 9- Cromatograma de HPLC-APCI-MS de TAGs presentes em óleo de jacaré.....	53
Figura 10- Espectro de ¹ H RMN do óleo de jacaré.....	56
Figura 11- Testes antifúngicos.....	58
Figura 12- Testes antibacterianos.....	59

Gráfico 1- Índices de acidez em mg KOH/g das amostras de óleo em 3 ambientes diferentes, durante 90 dias.....	49
Gráfico 2- Índices de peróxidos em mEq/Kg das amostras de óleo em 3 ambientes diferentes, durante 90 dias.....	51
Gráfico 3- % de células viáveis após contato com óleo de jacaré em diferentes concentrações, pelo método Alamar Blue.....	61
Gráfico 4- % de inibição de ROS utilizando diferentes concentrações de óleo de jacaré.....	62
Gráfico 5- % de células viáveis após tratamento com indometacina como controle positivo, em diferentes concentrações, e com o óleo de jacaré, em diferentes concentrações.....	64
Gráfico 6- Concentrações de NO quantificados após leitura em espectrofotômetro, com presença de indometacina em diferentes concentrações, e óleo de jacaré, em diferentes concentrações...	65

LISTA DE TABELAS E EQUAÇÕES

Tabela 1- Composição de óleos de origem animal com finalidade nutracêutica ou industrial (%).....	22
Tabela 2- Valores dos índices de acidez (em mg KOH/g) obtidos nas amostras em ambientes diferentes, durante 90 dias.....	49
Tabela 3- Valores dos índices de peróxidos (em mEq /Kg) obtidos nas amostras em ambientes diferentes, durante 90 dias.....	51
Tabela 4- TAGs identificados em óleo de jacaré.....	54
Tabela 5- Índices de ácidos graxos observados no óleo, em porcentagem.....	56
Equação 1- Índice de acidez.....	40
Equação 2- Índice de peróxidos.....	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

μ M- micromolar
AA- ácido araquidônico
AAPH- 2,2'-azobis amidinopropano
amu- unidade de massa atômica
APCI- ionização química a pressão atmosférica
ASD- ágar Sabouraud dextrose
COX- ciclooxigenase
DCFH-DA- 2',7'-dicloro-fluoresceína-diacetato
DHA- ácido docosahexaenoico
DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO- dimetilsulfóxido
DNA- ácido desoxirribonucléico
DP- desvio padrão
DPPH- 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA- ácido eicosapentaenóico
g- grama
GC- cromatografia gasosa
h- hora
HDL- lipoproteínas de alta densidade
HPLC- cromatografia líquida de alta eficiência
IL- interleucina
Kg- quilograma
kV- quilovolt
LC- cromatografia líquida
LDL- lipoproteínas de baixa densidade
LOX- lipooxigenase
LPS- lipopolissacarídeo
LT- leucotrieno
LTB- leucotrieno
M- molar
m/z- massa-por-carga
mEq- miliequivalente
mg- miligrama
min- minuto
mL- mililitros
mm- milímetro
MS- espectrometria de massas
MTT- brometo tiazolil azul de tetrazólio
N- normal
NK- natural killer
nm- nanômetro

NO- óxido nítrico
NOS- óxido nítrico sintase
ORAC- capacidade de absorção dos radicais oxigenados
PAF- fator de ativação plaquetária
PBS- Tampão fosfato-salino
PG- prostaglandina
PGI- prostaciclina
pH- potencial Hidrogeniônico
PL- fosfolipase
RDC- Resolução da Diretoria Colegiada
RMN- ressonância magnética nuclear
ROS- espécies reativas a oxigênio
RPMI- meio Roswell Park Memorial Institute
s- segundos
SBF- soro bovino fetal
TAG- triacilglicerol
TEAC- capacidade antioxidante trolox equivalente
TNF- fator de necrose tumoral
TPA- 12-O-tetradecanoilforbol acetato
TXB- tromboxano
UVB- ultravioleta B
V- volt
 μ L- microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Óleos	15
2.2 Óleos em alimentos	17
2.3 Ácidos graxos	18
2.4 Óleos em pescados	21
2.5 Jacarés	24
2.5.1 Jacaré-açu	25
2.5.2 Óleo de jacaré	26
2.6 Nutracêuticos	28
2.7 Ressonância Magnética Nuclear e Espectroscopia de Massas	31
2.8 Ação antibacteriana e antifúngica de óleos	34
2.9 Propriedades antioxidantes dos óleos	36
2.10 Propriedades anti-inflamatórias dos óleos	38
3. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo Geral	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Obtenção da matéria-prima	41
4.2 Caracterização de óleo de jacaré	41
4.2.1 Índice de acidez	41
4.2.2 Índice de peróxidos	42
4.3 Perfil lipídico do óleo	42
4.3.1 Análise em RMN	43
4.3.2 Análise de TAGs por HPLC-APCI-MS	43
4.4 Análise de potencial antifúngico do óleo	44
4.5 Análise de potencial antibacteriano do óleo	44
4.6 Análise de potencial antioxidante do óleo	45
4.6.1 Cultivo celular	45
4.6.2 Avaliação da citotoxicidade	45
4.6.3 Avaliação de atividade antioxidante	46
4.7 Análise de potencial anti-inflamatório do óleo	47
4.7.1 Avaliação da citotoxicidade	47
4.7.2 Inibição da ativação de macrófagos	47
4.7.3 Quantificação de nitrito	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Caracterização do óleo de jacaré	49
5.1.1 Índice de acidez	50
5.1.2 Índice de peróxidos	51
5.2 Perfil lipídico do óleo	54
5.3 Potencial antifúngico e antibacteriano do óleo	59
5.4 Potencial antioxidante do óleo	62
5.5 Potencial antiinflamatório	65
6. CONCLUSÃO	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1. INTRODUÇÃO

Os óleos de origem animal têm sido utilizados como fonte de nutrientes para benefícios clínicos e isso pode incluir óleos de origem Amazônica. Nesse contexto o aproveitamento de matérias-primas como fontes lipídicas na elaboração de nutracêuticos e de produtos farmacêuticos pode ser uma alternativa econômica para agregar valor às matérias-primas regionais.

Óleos e gorduras são substâncias hidrofóbicas compostas por ácidos graxos. Estes ácidos graxos são um grupo de ácidos carboxílicos com uma longa cadeia carbônica, apresentando ou não insaturações, sem ramificações, diferenciados pela presença de insaturações e pelo tamanho da cadeia que os compõem (MARTIN et.al., 2006). Na alimentação, os óleos e as gorduras agem como fornecedores de energia, veículos para vitaminas lipossolúveis, e são fontes de ácidos graxos essenciais, como ômega 3 e ômega 6 (CASTRO et.al., 2004). Estes ácidos graxos essenciais são substâncias que podem ser utilizadas em suplementos, fazendo parte dos chamados nutracêuticos, termo utilizado para indicar alimentos ou parte deles, que apresentam benefícios a saúde e segurança, além das funções nutricionais, excedendo níveis que podem ser encontrados em alimentos normais (PALTHUR et.al., 2010).

Os ácidos graxos ômega 3 e ômega 6 são muito discutidos pela sua utilização pelo organismo. São apontados como combatentes de doenças cardiovasculares e neurológicas, fortalecendo o sistema imune, auxiliando nas ações de plaquetas, entre outros (VAZ et.al., 2014). Estes ácidos graxos apresentam funções distintas, e seus efeitos fisiológicos são opostos, se fazendo necessário o devido equilíbrio entre eles no organismo, equilíbrio este devendo ser nas proporções de 5:1 para ômega 6/ômega 3. (MORAES & COLLA, 2006; SIMOPOULOS, 2008). Nos pescados, estes ácidos graxos essenciais apresentam variações dependentes de época e alimentação. Ainda assim, os peixes são considerados fonte de ômega 3, tendo então valioso

caráter nutricional, por isso seu óleo é geralmente utilizado na produção de suplementos alimentares e nutracêuticos (VITOR et.al., 2016).

Na região Amazonica, além dos pescados que tradicionalmente tem teor lipídico de interesse industrial, a gordura e o óleo dos crocodilianos vem sendo objeto de estudos, devido ao aumento no mercado de produtos de origem animal e vegetal, com foco nas aplicações nutricionais e farmacêuticas destes (BUTHELEZI, 2012). Estudos realizados com o jacaré-açu e o jacaretinga apontam para a presença de ácidos graxos essenciais na gordura destes animais, principalmente do jacaré-açu, que apresenta níveis significantes de ômega 3, o que torna sua gordura valiosa, de caráter funcional (KLUCZKOVSKI et al., 2016).

Outras pesquisas apontam para diversos usos de óleos e gorduras animais, havendo casos em que óleos de outros répteis, como cobras, tenham apresentado ação antibacteriana. Além disso, outras espécies animais como por exemplo emus e peixes apresentam ação anti-inflamatória em sua gordura (FALODUN et. al., 2008; SCHMEDA-HIRSCHMANN et. al., 2014). Estes efeitos são de grande importância na atualidade visto que são necessárias substâncias alternativas no tratamento de doenças e no combate a infecções.

Tendo isto em mente, as espécies crocodilianas da região Amazônica apresentam potencial para disponibilizar óleo que possa ser utilizado em novos produtos. Este trabalho tem como finalidade analisar as potenciais ações do óleo de crocodilianos da Amazônia, com foco no jacaré-açu (*Melanosuchus niger*), para possível utilização em formulações nutracêuticas, como suplementos, e farmacêuticas, de modo a inserir este produto no mercado.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Óleos

Óleos e gorduras fazem parte do grupo dos lipídeos, substâncias químicas que tem como característica marcante a sua insolubilidade em água, sendo então classificados como hidrofóbicos. Lipídeos são os ácidos graxos (principais componentes dos óleos e gorduras, assim como o glicerol) e seus derivados, ceras, carotenóides, e esteróis, por exemplo, apresentando cadeias orgânicas longas, com elevado número de carbonos e hidrogênios, podendo ainda apresentar heteroátomos, ou grupamentos funcionais, como ácidos carboxílicos e fenóis. Desde os egípcios da antiguidade até o século XIX, óleos e gorduras eram grandes fontes de combustível para iluminação, lubrificantes de equipamentos mecânicos, fabricação de tinturas e sabões. (FAHY et. al., 2005; MELLO & SUAREZ, 2012)

Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2005) os óleos e as gorduras são classificados não pela fonte, mas pelo seu ponto de fusão na temperatura de 25°C. Pelo ponto de fusão, óleos são substâncias que se apresentam em estado líquido a temperatura de 25°C, e gorduras estão em estado sólido ou pastoso nestas mesmas condições. Um fator chave na determinação de um lipídeo como sendo gordura ou óleo está na presença de insaturações ao longo de sua cadeia. Quanto mais insaturado for um lipídeo, maiores chances dele se apresentar como um óleo, pois a insaturação traz o ponto de fusão para baixo. Desta forma, um lipídeo que apresenta apenas ácidos graxos saturados terá alto ponto de fusão, logo será apresentado em estado sólido a temperatura ambiente. (PUPA, 2004).

Os ácidos graxos que compõem os óleos e as gorduras são um grupo de ácidos carboxílicos que apresentam uma longa cadeia carbônica, podendo ser insaturada ou não. Estas substâncias geralmente se apresentam com um número par de carbonos, sem presença de ramificações; dessa forma, os ácidos graxos são diferenciados uns dos outros pelo tamanho da cadeia e pelas insaturações (MARTIN et.al., 2006).

As insaturações mencionadas se referem à presença de ligações duplas ao longo da cadeia do ácido graxo. Desta forma, os ácidos graxos são classificados de acordo com a quantidade de insaturações presentes na cadeia. Ácidos graxos monoinsaturados, como o ácido oleico (16:1), apresentam apenas uma insaturação na sua cadeia carbônica. Os di-insaturados apresentam duas insaturações, como no caso do ácido linoleico (18:2), e os poli-insaturados apresentam três ou mais insaturações, como o ácido linolênico (18:3) e o ácido araquidônico (20:4) (Figura 1). No caso dos saturados, estes são ácidos graxos que possuem apenas ligações simples, tendo como alguns dos principais ácido butírico (4), láurico (12), palmítico (16) e esteárico (18). Estes ácidos saturados se apresentam geralmente seguindo a fórmula $C_nH_{2n}O_2$ (PUPA, 2004).

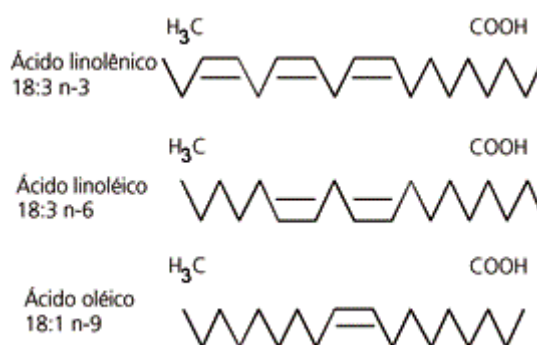


Figura 1- Estrutura dos ácidos graxos linolênico, linoléico e oléico.
 Fonte: GAROFOLO & PETRILLI, 2006

Os ácidos graxos presentes em óleos e gorduras estão geralmente combinados com glicerol, para formação de monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos, estes sendo os compostos predominantes destas substâncias. Apesar disso, estes não são os únicos componentes presentes nos óleos e gorduras, visto que impurezas vindas da fonte de origem do óleo podem estar presentes. Entre estas impurezas, é possível que sejam encontradas outras substâncias lipídicas, como os esteróis, mas também é possível que se encontrem substâncias não lipídicas, como isoflavonas e até mesmo compostos metálicos, tendo como exemplo a clorofila. (FERRARI et.al., 1996; SUAREZ et.al., 2007).

2.2 Óleos em alimentos

Óleos e gorduras têm um papel fundamental na alimentação humana. Além de fornecerem calorias, agem como veículo para as vitaminas lipossolúveis, como A, D, E e K. Também são fontes de ácidos graxos essenciais como o linoleico, linolênico e araquidônico, ácidos que não são produzidos pelo organismo e devem ser adquiridos pela alimentação (CASTRO et.al., 2004; COSTA et. al., 2013)

Uma boa parte da discussão dos óleos e gorduras em relação à saúde envolvem os efeitos ruins destes no organismo, onde na realidade a discussão é sobre os efeitos nocivos que o excesso deles pode causar. Lipídeos são importante fonte de energia para o bom funcionamento do corpo, sendo também responsáveis por suporte estrutural para o organismo, e providenciam ao corpo substâncias necessárias para regulação de determinados processos biológicos. Eles são grande fonte de energia para o corpo, servindo como um reservatório para casos em que o corpo precise de energia a mais para realização de alguma atividade. Isso se dá pelo fato de que gorduras fornecem 9 calorias por grama, maior quantidade que proteínas ou carboidratos, que fornecem apenas quatro. Mas o tecido adiposo ainda possui outras funções, como sendo um isolante térmico, ajudando a manter a temperatura do corpo em ambientes mais frios, e também como um colchão, absorvendo impactos contra o corpo, assim protegendo os órgãos. (AKOH & MIN, 2002; BOTHAM & MAYES, 2012).

De acordo com a composição destes ácidos, seus efeitos no organismo se diferenciam. Estudos apontam uma relação entre alto consumo de ácidos graxos saturados e aumento nos níveis de colesterol. Apesar disso, o consumo de ácidos graxos insaturados tem sido recomendado com intuito de melhorar o perfil lipídico do corpo, visto que estudos apontam que dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados não estão livres de alguns efeitos negativos, onde se apresentam que estes ácidos graxos possuem capacidade de aumentar os níveis de oxidação

do LDL-colesterol, e reduzir os níveis da fração HDL-colesterol (ALMARIO et.al., 2001; SALES et.al., 2005)

2.3 Ácidos graxos

Ácidos graxos proporcionam muito benefícios a saúde, isso é um fato que se observa ao ver que existem muitos suplementos com óleo de peixe, rico em ácidos graxos poli-insaturados. O papel destes ácidos na alimentação humana é um grande foco de estudos e investigações. Existem estudos que apontam redução de pressão arterial, aumento da eficácia de anti-hipertensivos e redução dos riscos de doenças cardiovasculares, se for adotado uma dieta com suplementação de ômega 3, atividades físicas e redução de consumo de sódio. Os responsáveis por este efeito anti-hipertensivo são os ácidos graxos poli-insaturados: ácido eicosapentaenóico (EPA; 20:5 n-3) e ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 n-3). Quanto a sua ação, o DHA se apresenta como maior responsável pelos efeitos de redução de lipídeos e lipoproteínas, bem como redução da pressão sanguínea e controle da glicemia, quando comparado ao EPA. Em conjuntos, ambos atuam no metabolismo dos triglicerídeos, pressão arterial, excitabilidade cardíaca, processos inflamatórios, nas funções plaquetárias e endoteliais, e na (LIMA, 2004; PIOVESAN, 2009; SOARES et.al., 2016).

Com relação ao benefício do ômega 3 para os casos de câncer, a literatura apresenta que o mecanismo de ação acontece na carcinogênese, onde inicia-se uma supressão da biossíntese dos eicosanóides derivados do ácido araquidônico, resultando nas alterações da resposta imunológica às células tumorais e modulação da inflamação; impacto na proliferação celular, na apoptose, na disseminação de metástases e na angiogênese. Influencia também na atividade do fator de transcrição nuclear, na expressão gênica e nas vias de transdução de sinais, levando a mudança no metabolismo celular, crescimento e diferenciação das células e alteração no metabolismo do estrogênio. Geram menor estímulo ao crescimento das células hormônio dependente, aumento ou diminuição da produção de radicais livres. Evidências sugerem que

esses lipídeos alterem as funções celulares modulando a estrutura e função de domínios lipídicos específicos dentro da membrana plasmática (CARMO & CORREIA, 2009).

Ao se agrupar os diversos estudos relacionados a ômega 3, são apontadas as seguintes funções: combate e prevenção de doenças cardiovasculares e neurológicas, ajuda na prevenção e tratamento de alguns cânceres, contribui com desenvolvimento infantil, fortalece resposta imunológica, auxilia na coagulação sanguínea, colabora com o tratamento da diabetes, age no controle do colesterol, entre outros (VAZ et.al., 2014).

Em relação aos ácidos graxos ômega 6, os que se destacam são o linoléico (C18:2 – dezoito carbonos e 2 insaturações) e o araquidônico (C20:4 – 20 carbonos e 4 insaturações). O ácido linoleico é encontrado por exemplo, no óleo de girassol, e no corpo humano, é transformado em ácido araquidônico, além de outros ácidos graxos poli-insaturados. Estes ácidos obtidos pela transformação de ácido linoleico exercem uma série de funções no organismo, participando da estrutura de membranas celulares, na ação antiagregadora de plaquetas, na permeabilidade dos vasos sanguíneos, exercendo influência sobre a viscosidade do sangue e em funções plaquetárias. Um ponto importante se dá no devido equilíbrio que deve ser mantido entre os níveis de ômega 3 e ômega 6. De acordo com alguns nutricionistas, as proporções de ômega 6 devem ser de 5:1 em relação ao ômega 3. Com os avanços na agricultura moderna, a dieta da população vem apresentando níveis elevados de ômega 6, e níveis baixos de ômega 3, o que leva a uma proporção de 20:1 de ômega 6/ ômega 3, bem fora do ideal (MORAES & COLLA, 2006).

Produtos derivados dos ácidos graxos poli-insaturados ômega 6 (prostaglandinas PGE2 ou leucotrienos LTB4), pela síntese de ácido araquidônico, são mediadores de grande ação na trombose e nos processos inflamatórios, bem mais do que os mediadores obtidos por meio de ômega 3 (prostaglandinas PGE3 e leucotrienos LTB5), pela síntese do ácido eicosapentaenóico (Figura 2). Logo, uma alimentação desbalanceada com excesso de ômega 6 tem caráter altamente pró-trombótico e pró-inflamatório. Nesses casos, a dieta contribui para doenças como

aterosclerose, obesidade e diabetes. O consumo de níveis aceitáveis de ômega 3 tem sido associado a baixa incidência dessas doenças, fato observado em populações da Islândia e do Alasca (SIMOPOULOS, 2016).

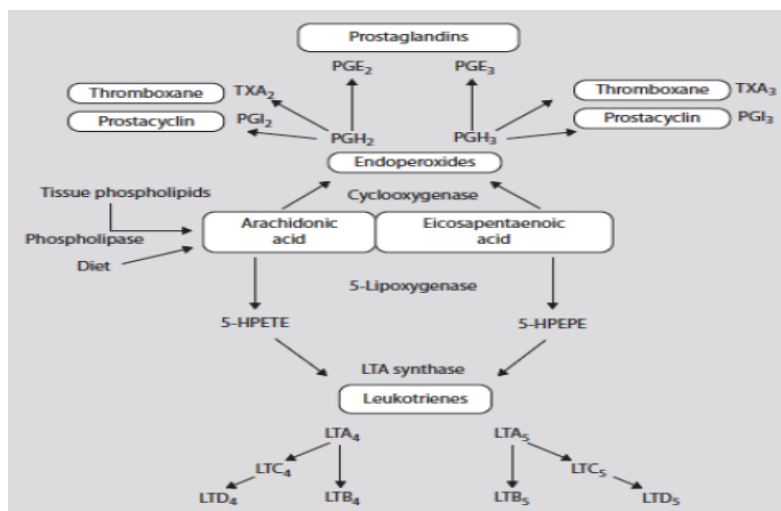


Figura 2- Uso de ômega 3 (ácido eicosapentaenóico) e ômega 6 (ácido araquidônico) no organismo.
Fonte: SIMOPOULOS, 2016

Os ácidos graxos ômega 3 e ômega 6 não são conversíveis entre si, e apresentam funções e metabolismos distintos, geralmente com efeitos fisiológicos opostos, por isso o equilíbrio entre eles numa dieta corretamente balanceada é essencial. Ao ingerir ômega 3 de peixes ou de óleos de peixes, o ômega 3 substitui os ácidos ômega 6 nas membranas celulares, principalmente em plaquetas, neutrófilos, monócitos e em células do fígado. Os elevados níveis de ômega 6 na alimentação da população ocidental levam a um aumento dos metabólicos obtidos do ácido araquidônico (SIMOPOULOS, 2008).

Desta forma, prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas são formados em grandes quantidades, e as formas obtidas através de ômega 6 são biologicamente mais ativas em menores quantidades. Assim, níveis elevados de ômega 6 levam a maiores chances de formação de trombos e ateromas, proliferação celular, e contribuem para desordens de caráter inflamatório e alérgico. Neste panorama, se observa então que excesso de ômega 6 pode levar a um estado fisiológico pró-inflamatório, pró-agregatório, pró-trombótico, e a maior viscosidade sanguínea, vaso espasmo e vaso constrição. Em comparação, excesso de ômega 3 leva a baixa agregação

plaquetária, vasodilatação e baixa viscosidade sanguínea. Isso ocorre pois os derivados de ômega 3 e ômega 6 competem pelos mesmo sítios de ligação, e o excesso de qualquer um deles pode levar a problemas de saúde opostos, mas não menos graves (SIMOPOULOS, 2008; SIMOPOULOS,2011).

2.4 Óleos em pescados

Os perfis de ácidos graxos de óleos de pescado apresentam variações devido a época em que o pescado foi capturado, bem como a alimentação deste durante sua vida. Estes óleos são considerados valiosos numa visão nutricional, visto que eles são uma das grandes fontes de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3. Porém, em muitos casos, as impurezas presentes nestes óleos fazem com que processos de refinamento sejam necessários para que se tenha maior aproveitamento das características nutricionais destes produtos (VITOR et.al., 2016).

Peixes de água doce costumam apresentar maior concentração de ácidos graxos poli-insaturados com cadeias de 18 carbonos, mas apresentam níveis mais baixos de ômega 3 se comparados a peixes marinhos. Porém, Martins et.al., 2017, aponta para a capacidade que peixes de água doce tem para converter ácidos graxos de cadeias menores em ácidos graxos do tipo ômega 3. Essa capacidade permite que alimentos com menores valores nutricionais sejam convertidos em alimentos com maiores valores nutricionais. Quanto a presença de gorduras e óleos, os peixes podem ser classificados em: peixes gordos (>8%), peixes meio-gordos (4-8%), peixes magros (2-4%) e peixes muito magros (<2%). Estudos feitos com pirarucu (*Arapaima gigas*) indicam que este peixe amazônico pode ser considerado um peixe meio-gordo, onde a divisão de ácidos graxos se dá da seguinte forma: ácidos graxos monoinsaturados > ácidos graxos saturados > ácidos graxos poli-insaturados, com predominância de ácidos graxos 18:1, 16:0 e 18:0. Apesar disso, como mencionado, ele ainda apresenta níveis relativamente elevados de ômega 3 se comparado aos ácidos ômega 6. Isso se dá provavelmente pela capacidade destes peixes de converter cadeias.

Os modelos atuais de cultura de peixes acabam produzindo peixes com níveis menores de ômega 3 se comparados aos peixes que vivem naturalmente em rios, lagos e oceanos. Isso ocorre, pois a dieta do peixe influencia fortemente os níveis de ácidos graxos destes animais, onde eles se alimentam basicamente de grãos quando criados em cativeiro, visto que o foco geralmente é nos custos, e não nos valores nutricionais. O conhecimento da composição lipídica dos peixes é essencial para o comércio, principalmente numa visão nutricional. As variações sazonais também influenciam não só na composição lipídica dos peixes, mas também no sabor e na estabilidade, sendo estes parâmetros relacionados à oxidação das gorduras do animal. Estudos realizados com o mapará (*Hypophthalmus* sp.) indicam estas variações, onde as concentrações de ácidos graxos 18:0, 16:1, 18:1 e 20:5 são as predominantes na musculatura do peixe em períodos de cheia, e em períodos de seca, a predominância passava para 14:0, 17:0 e 18:2. As concentrações de ácidos graxos também dependem da parte do peixe, onde em peixes como o atum, existe grande concentração de ômega 3 nas áreas ao redor dos olhos destas espécies (INHAMUNS & FRANCO, 2001). A tabela 1 apresenta composição de óleos de alguns pescados utilizados industrialmente.

O óleo de pescado vem sendo usado desde os anos 1960, onde deste período até os anos 1990 foi utilizado na sua forma hidrogenada para produção de margarinas, com uma pequena porção sendo utilizada em couro e em tinturas. Durante a década de 1980, o crescimento na produção de salmão fez com que o óleo de peixe se tornasse a opção de escolha como fonte de lipídeos, ocupando uma parcela de 20% da produção (SHEPHERD & JACKSON, 2013).

Tabela 1- Composição de óleos de origem animal com finalidade nutracêutica ou industrial (%).

		Autores		
Ácido Graxo		Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) de Alto Alegre, Roraima (FILHO et.al., 2013)	Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) (SULOMA et.al., 2008)	Salmão do Atlântico(<i>Salmo salar</i>) das Ilhas Féroe (LÖVKVIST,2014)
(C 14:0)	Ácido Mirístico	1,05±0,03%	0,72±0,14%	3,23±0,01%
(C 14:1)	Ácido Miristoleico	0,45±0,01%	-	0,09%
(C 16:0)	Ácido Palmítico	20,48±0,01%	23,92±0,40%	10,30±0,07%
(C 16:1)	Ácido Palmitoleico	2,94±0,21	2,21±0,45%	3,59±0,02%
(C 17:0)	Ácido Margárico	0,36±0,03%	0,92±0,06%	0,16±0,01%
(C 18:0)	Ácido Esteárico	9,60±0,17%	9,23±0,55%	2,32±0,02%
(C 18:1) (ω 9)	Ácido Oleico	26,84±0,48%	6,46±0,53%	31,50±0,42%
(C 18:2) (ω 6)	Ácido Linoleico	10,81±0,54%	1,43±0,09%	9,24±0,17%
(C 18:3) (ω 3)	Ácido Linolênico	1,82±0,06%	0,56±0,08%	3,84±0,03%
(C 20:0)	Ácido Araquídico	0,15±0,01%	-	0,26%
(C 20:1) (ω 9)	Ácido Gadoleico	0,90±0,02%	-	6,88±0,09%
(C 20:2)	Ácido Eicosadienoico	-	0,19±0,02%	0,90±0,02%
(C 20:3) (ω 6)	Ácido Eicosatrienoico	0,31±0,01%	0,50±0,02%	0,15%
(C 20:4) (ω 6)	Ácido Araquidônico	-	9,36±0,47%	0,35±0,14%
(C 22:0)	Ácido Behênico	-	0,33±0,03%	0,12%
(C 22:1)	Ácido Euríico	0,25±0,02%	-	7,36±0,03%
(C 22:5) (ω 3)	Ácido Docosapentaenoico	-	5,06±0,43%	1,60±0,04%
(C 22:6) (ω 3)	Ácido Docosaheptaenoico	-	16,27±0,30%	6,09±0,05%

Até 2010, estima-se que cerca de 71% do óleo de peixe havia sido usado em aquacultura, e 24% foi utilizado para consumo humano, após processos de refinamento do óleo. Este aumento se deu pelos níveis elevados de ácidos graxos necessários para uma dieta balanceada, sendo oferecidos a população na forma de cápsulas de suplemento, alimentos funcionais e nutracêuticos (Figura 3). O mercado então cresceu, onde em 2008 cerca de 123 mil toneladas de óleo bruto davam origem a 66 mil toneladas de óleo refinado, e em 2010, já se estimava cerca de 200 mil

toneladas de óleo bruto, com valor de mercado de cerca de 25% a mais que o valor ofertado para aquacultura (SHEPHERD & JACKSON, 2013).



Figura 3- Cápsulas de óleo de peixe, utilizadas como suplementos.

Fonte: Retirado de: <<https://www.blogdefarmacia.com/el-aceite-de-pescado-para-cuidar-la-piel/>>. Acesso em: 01 de agosto de 2018

2.5 Jacarés

Crocodilianos são animais que se posicionam no topo da cadeia alimentar, exercendo função de controladores da população de outras espécies de animais, como as piranhas, na Região Amazônica. Não apenas isso, são animais de importância econômica, devido a utilização de sua pele para fabricação de carteiras e bolsas, por exemplo, além de sua carne e outros produtos. Devido a este potencial econômico, são animais que sofrem as consequências não só da caça ilegal e indiscriminada, como também tem problemas de habitat, devido a destruição destes, ao ponto de todas as espécies mundias estavam, nos anos 90, correndo risco de extinção. Programas de incentivo a conservação e criação em cativeiro destes animais já foram criados, mas enfrentam problemas pois, salvo exceções, não existem muitas informações precisas quanto a biologia básica de muitas espécies, visto que uma boa parte das pesquisas se concentram no aligátor americano (*Alligator mississippiensis*) e no crocodilo do Nilo (*Crocodylus niloticus*). No Brasil, são encontradas seis espécies de crocodilianos, e mesmo havendo programas de incentivo a conservação destes animais, ainda são necessárias mais informações a cerca da ecologia e fisiologia destas espécies. Sendo heterotérmicos, as condições ambientais influenciam muito na

sobrevivência dos jacarés, o que implica ainda mais atenção necessária para preservação destes animais (GOMES et.al., 2014).

A criação de jacaré em cativeiro visa não apenas a preservação das espécies, mas também fazer uso integral do animal, desde sua urina, que é utilizada como fixador na indústria de perfumes, até sua carne para consumo e sua pele para fabricação de produtos como bolsa, sapatos e acessórios. No Brasil, são abatidos cerca de 10 mil jacarés por ano, o que não é nem próximo do líder mundial, a Colômbia, onde se abatem cerca de 600 mil jacarés por meios legais, e mais de um milhão de abates clandestinos. Na África e Austrália, juntas, se abatem cerca de 60 mil crocodilos legalmente. A pele destes crocodilianos é formada por uma complexa rede de placas interligadas de várias formas e tamanhos, levando cerca de 20 dias para o preparo desta para a tintura e uso na produção de bens comerciais. A carne é um alimento exótico de caráter nobre, contribuindo na dieta, apresentando proteínas, ácidos graxos essenciais, e vitaminas, com níveis reduzidos de lipídeos totais e níveis mais elevados de ácidos graxos poli-insaturados se comparados a animais domésticos (SOUZA et.al., 2014).

2.5.1 Jacaré-açu

O jacaré-açu (*Melanosuchus niger*) é um crocodiliano pertencente a ordem Crocodylia, família Alligatoridae, também chamado de Caiman negro, black caiman e lagarto negro. Seu nome significa “crocodilo negro” e é derivado de “melas” (do grego, “negro”) e “soukhos” (“crocodilo”). “Niger” vem do latim, e também referencia a cor escura da espécie (Figura 4). É uma espécie que se alimenta de vários animais, de capivaras e cachorros, até gado. Relatos afirmam que os crocodilianos não fazem mais que 50 refeições completas no ano, devido a sua estratégia de conservação de energia. Estes animais basicamente esperam parados por suas presas, ao invés de caçar, o que reduz muito os gastos de energia. Estes animais possuem estômago extremamente ácido, a ponto de digerir totalmente carne e ossos ingeridos (SOUZA et.al., 2014).



Figura 4- Jacaré-açu.

Fonte: Retirado de: <<https://www1.folha.uol.com.br/folhinha/2016/01/1733679-jacare-gigante-de-4-metros-chega-de-aviao-ao-zoologico-de-sao-paulo.shtml>>. Acesso em: 22 de junho de 2019.

O jacaré-açu se encontra distribuído pela bacia Amazônica, com mais de 70% estando em território brasileiro, por toda a região Norte e em Goiás e no Mato Grosso. As demais regiões se distribuem pela Colômbia, Equador, Bolívia, Guiana Francesa, Guiana e Peru. Esta espécie pode ser encontrada em corpos de rios de águas brancas, ricas em sedimentos, e também em rios de águas pretas, com menos nutrientes e pH mais ácido. Por toda sua área de distribuição, o jacaré-açu ocupa grandes rios, lagoas, várzeas e áreas sazonais inundáveis. Os machos da espécie ultrapassam os 5 metros de comprimento e as fêmeas chegam a até 3 metros (COUTINHO et al., 2006; THORBJARNARSON, 2010; MARIONI et.al., 2013).

2.5.2 Óleo de jacaré

A gordura e o óleo de algumas espécies de crocodilianos vêm sendo estudadas ao longo dos anos, visto que atualmente existe um mercado grande para novos produtos de origem animal e vegetal, com aplicações nutricionais e farmacêuticas. Sabe-se que alguns grupos da África e China usam o óleo de crocodilos do rio Nilo na medicina tradicional, havendo documentação de efeitos anti-inflamatórios e antimicrobiano destes óleos (BUTHELEZI, 2012).

Na análise de ácidos graxos da carne *in natura* de jacaré-do-papo-amarelo (*Caiman latirostris*), se constatou maior presença do ácido graxo monoinsaturado oleico 18:1, seguido de ácido linoleico 18:2, um ácido ômega 6, e por último, ácido graxo saturado palmítico 16:0. Nesta espécie de jacaré, os ácidos graxos saturados equivalem a 28,5% do total de ácidos graxos, os monoinsaturados correspondem a 42,5%, e os poli-insaturados, 29%. É importante ressaltar a

elevada concentração de ácido linoleico, com 27,4% do total, e de ácidos da série ômega 3 correspondendo a 1,55% do total, o que indica que este óleo tem potencial como fonte de ácidos graxos essenciais (AZEVEDO et.al., 2009).

O crocodilo do Nilo (*Crocodylus niloticus*) apresentou diferenças na composição de ácidos graxos da gordura intramuscular e da gordura do tecido adiposo, onde a muscular apresenta menores níveis de ácido oleico 18:1 (cerca de $27,3 \pm 2,1\%$ na muscular e $34,2 \pm 0,3\%$ no tecido adiposo) mas apresenta maiores níveis de poli-insaturado 20:4 (cerca de $4,2 \pm 1,1\%$ na muscular e $0,8 \pm 0,1\%$ no tecido adiposo). Crocodilos de cativeiro apresentaram altos níveis de ácido palmítico 16:0 ($25,4 \pm 3,0\%$), oleico 18:1 ($43,1 \pm 2,1\%$) e linoleico 18:2 ($9,1 \pm 6,9\%$), justificado pela dieta destes animais sendo composta em 80% de carne de galinha, ricas nestes ácidos graxos. Quanto às diferenças entre os perfis lipídicos de crocodilos de cativeiro e selvagens, os de cativeiro apresentavam níveis mais elevados de ácidos graxos monoinsaturados ($40.7 \pm 0.3\%$ vs $37.3 \pm 2.6\%$) e de ácidos poli-insaturados totais ($32.4 \pm 0.4\%$ vs $27.3 \pm 1.9\%$), tendo também como causa a dieta rica em carne de galinha. Em contrapartida, níveis de ácidos graxos ômega 3 eram maiores em animais selvagens do que em animais de cativeiro ($16.2 \pm 2.2\%$ vs. $2.4 \pm 0.1\%$), devido a dieta natural de peixes (OSTHOFF et.al., 2010).

Os perfis lipídicos de jacaretinga (*Caiman crocodilos*) e de jacaré-açu (*Melanosuchus niger*) foram feitos por Kluczkovski et al., 2016., onde não se observavam diferenças significativas no conteúdo de lipídeos totais entre as duas espécies (0.02 g% em jacaretinga e 0.6 g% em jacaré-açu). Os ácidos graxos detectados em jacaretinga foram: ácido palmítico 16:0 (0,12%), ácido palmitoleico 16:1 (0,01%), ácido esteárico 18:0 (0,06%), ácido oleico 18:1 (0,05%) e ácido eicosatrienóico 20:3 (0,04%). Em ambas as espécies, foram observadas maiores concentrações de ácidos graxos saturados do que mono e poli-insaturados, onde o jacaré-açu apresentava níveis maiores de ácido palmítico e esteárico. Os níveis de ácidos graxos ômega 3 estavam abaixo dos limites de detecção do equipamento utilizado, mas foi constatada presença

de 0,03% de ácido eicosapentaenoico em jacaré-açu. O ômega 9 se fazia presente com predominância de ácido oleico, mas sem diferença significativa entre as duas espécies. Ainda foi constatado 0,88% de ácido docosahexaenoico em tecido adiposo e 0,75% em gordura somática de jacaré-açu, níveis significantes visto que este ácido graxo é um dos essenciais, não sintetizados pelo corpo humano, sendo então considerado uma substância funcional, muito valorizada atualmente.

2.6 Nutracêuticos

Ao se falar de nutracêuticos, é necessário se fazer uma distinção entre este termo e os chamados “alimentos funcionais”. Alimentos funcionais possuem definições diferentes em cada país, e no Brasil eles são definidos como “todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido na dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguro para o consumo, sem supervisão médica”, de acordo com a portaria nº. 398 de 30 de abril de 1999, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde.

Pesquisas então foram feitas para que se obtivessem novas alternativas nutritivas para a sociedade moderna, com foco na saúde através de uma alimentação adequada ou por meio de suplementos alimentares. Assim, muitos dos suplementos divulgados são apresentados como nutracêuticos, um termo criado nos anos 80, combinando as palavras nutrição e farmacêutico, sendo então relacionados a alimentos e compostos que tem maior relação com a saúde de um indivíduo, como suplementos alimentares, nutrientes, produtos herbais ou alguns alimentos processados com foco em saúde. Desta forma, nutracêuticos são definidos como “substâncias que podem ser um alimento ou parte de um alimento que proporcionam benefícios medicinais, incluindo prevenção ou tratamento de doenças”. Além desta, Palthur et.al., 2010, analisou diversas definições de nutracêuticos em 25 países, e definiu nutracêuticos como “alimento, ou parte de um alimento para administração oral com benefícios de saúde e segurança demonstrados

para além das funções básicas nutricionais da suplementação alimentar, apresentando-se em matrizes não alimentares ou em formas alimentares não convencionais, em tal quantidade que exceda aquela que pode ser obtida nos alimentos normais na frequência requerida para atingir tais propriedades, é designado de nutracêutico” (MORAES & COLLA, 2006; ESPÍN et.al., 2007; REBELLO et.al., 2014).

A prevenção e tratamento com nutracêuticos é considerado de grande utilidade em se tratando da saúde pública e como instrumento contra ocorrência de agravantes nutricionais na população e doenças crônicas, pela longevidade e melhora na qualidade de vida por meio destas substâncias. Um outro ponto se faz com técnicas bioquímicas que apontam para o que é necessário para o bom funcionamento do organismo a nível molecular, o que então se torna conhecimento para maior entendimento quanto a carência de micronutrientes e os efeitos que estes causam sobre a saúde (KRÄMER et al., 2001; ANDLAUER & FÜRST, 2002).

Infelizmente, muitos países não reconhecem oficialmente o termo nutracêuticos, o que faz com que certas substâncias sejam classificadas apenas como suplementos dietéticos, como é o caso dos Estados Unidos, e mesmo do Brasil. Por causa disso, existem diversos produtos comercializados que apresentam, entre seus componentes, substâncias com algum efeito farmacológico, mas são vendidos como suplementos dietéticos livremente. No Brasil, a Anvisa publicou a RDC nº 243 em 2018, que define suplemento alimentar como “produto para ingestão oral, apresentado em formas farmacêuticas, destinado a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos, isolados ou combinados”. Além dela, foi publicada a Instrução Normativa nº 28 de 2018, que define as substâncias constituintes de suplementos alimentares, bem como seus limites, reunindo substâncias classificadas como vitaminas, minerais, probióticos, substâncias bioativas, complementos alimentares para gestantes, suplementos para atletas e nutrízes. Já na Europa, a legislação aponta que um produto de caráter alimentício não pode ser apresentado como um

produto capaz de modificar ou restaurar funções fisiológicas do organismo, tampouco pode ser apresentado como alternativa no tratamento ou controle de doenças. Neste panorama, e se analisando a definição de um produto nutracêutico, a legislação européia classificaria diversas substâncias como sendo medicamentos, ao invés de componentes ou produtos alimentares (BRASIL, 2018 *a*; BRASIL, 2018 *b*; CASTELLINI et.al., 2002; GULATI & OTTAWAY, 2006).

Um desafio em relação aos produtos nutracêuticos se dá pelo controle de qualidade destes, visto que não há uma orientação oficial quanto a como proceder com eles. As Farmacopéias são as responsáveis por apresentar estes procedimentos, mas mesmo elas enfrentam a dificuldade de se encontrarem incompletas, visto que a Farmacopéia Brasileira, por exemplo, não descreve produtos como sendo nutracêuticos, e a Americana apresenta poucas monografias nos capítulos relacionados a suplementos dietéticos. Diante disto, se observa que existem diversos produtos apresentados como nutracêuticos no mercado, mas existem poucas informações em relação aos testes de controle de qualidade destes produtos, bem como avaliação de eficácia e segurança destes (LIRA et.al., 2009).

Outro ponto complexo em relação a eles se dá pela análise da composição do produto apresentado como nutracêutico, visto que estes se referenciam a diversas classes de componentes e substâncias, podendo ser representados apenas por uma substância, ou por uma mistura de diversos produtos obtidos de extratos vegetais, animais, ou outros meios de produção. Analisar um produto com apenas um único constituinte químico é feito de forma direta e com maior facilidade, porém um produto formado por mistura complexa de substâncias exige uma série de métodos analíticos, e os diferentes perfis de cada substância podem apontar para diferentes critérios quando se trata da qualidade. Mesmo que dois produtos apresentem uma mesma substância, o padrão para cada um será diferente, o que torna ainda mais difícil a padronização dos testes a serem feitos (KRUGER & MANN, 2003).

Os nutracêuticos apresentam então diversas funções e propriedades, divididos em várias categorias de substâncias. Aminoácidos como N-acetilcisteína, carotenoides, ácidos graxos, flavonoides, sais minerais e vitaminas são só algumas das substâncias que apresentam propriedades que as enquadram como nutracêuticos, agindo como antioxidantes, antibacterianos e antifúngicos, na síntese de DNA, no controle de inflamação, entre diversos outros papéis desempenhados pelos nutracêuticos (SOUYOUL, 2018).

2.7 Ressonância Magnética Nuclear e Espectroscopia de Massas

A ressonância magnética (RM) é uma propriedade física dos núcleos de átomos onde estes emitem ondas de rádio sinal, quando submetidos a fortes campos magnéticos, excitados por ondas de rádio numa determinada frequência. Estes sinais liberados podem então ser captados por uma antena e então transformados em picos, ou até mesmo em imagens. O núcleo mais simples conhecido é o do hidrogênio, que é constituído de apenas um próton, este possuindo *spin*, uma propriedade que permite que este próton possa girar sob o seu próprio eixo, agindo basicamente como o movimento de rotação da Terra (PYKETT et al., 1982; VILLAFANA, 1988; HAGE & IWASAKI, 2009).

O próton possui não apenas o spin, mas também o chamado momento magnético, o que o permite agir como um pequeno ímã. Isso ocorre devido a dois motivos: a carga elétrica positiva que um próton possui, e o movimento de girar sob o próprio eixo. Um objeto que apresente carga elétrica e este movimento de rotação será envolto por um campo magnético chamado de dipolo magnético. Logo, um próton é um dipolo magnético (Figura 5). Dipolos magnéticos tanto produzem campos magnéticos, como também reagem a campos magnéticos de qualquer outra fonte. A ressonância magnética nuclear (RMN) é então a reação do dipolo magnético de um núcleo quando sujeito a um campo magnético, onde os núcleos com spin absorvem ondas de rádio, se excitam e emitem sinais captados por equipamentos, sendo muitas vezes feita com foco

nos átomos de hidrogênio ^1H e carbono ^{13}C , buscando identificar as estruturas de compostos e onde e como estes átomos estão posicionados (PYKETT et al., 1982; SMITH & RANALLO, 1989; ASSHEUER & SAGER, 1997; HAGE & IWASAKI, 2009).

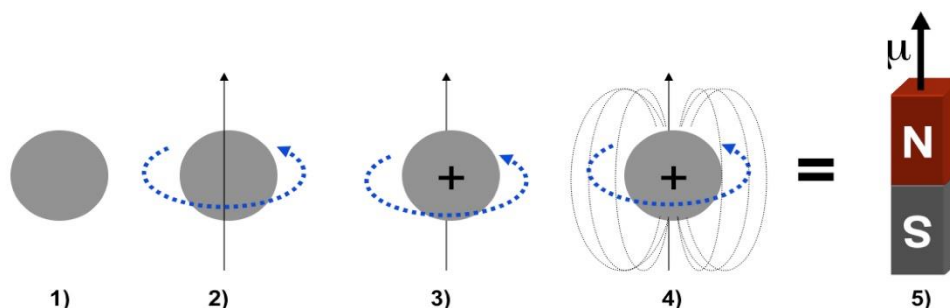


Figura 5-Spin do átomo de hidrogênio. (1) O átomo visto como uma esfera, (2) que então apresenta spin. (3) Sendo uma partícula de carga positiva, (4) é gerado um campo eletromagnético, tornando um dipolo magnético, (5) como se fosse um ímã.

Fonte: Retirado de <<http://rle.dainf.ct.utfpr.edu.br/hipermidia/index.php/ressonancia-magnetica/principios-fisicos-rosso/spin-e-o-momento-magnetico>>. Acesso em: 09 de julho de 2019.

Ressonância magnética nuclear de alta resolução é um método amplamente utilizado em análises de lipídeos, ao permitir elucidação estrutural, análises quali e quantitativa de diversas moléculas, mesmo quando se analisam estruturas mais complexas. A RMN se apresenta como uma alternativa com certas vantagens se comparada a outros métodos de análises, como cromatografia gasosa ou líquida de alta eficiência, por ser um método não-destrutivo e não precisar de padrões específicos para quantificar uma determinada substância. Um ponto negativo se dá pela sensibilidade, considerada apenas entre baixa e moderada, além de uma certa limitação em análises estruturais de lipídeos pois os sinais acabam se sobrepondo quando feitas análises de hidrogênio. Mesmo assim, os avanços no campo, com melhor processamento de dados com o passar do tempo fazem com que a espectroscopia por RMN esteja se tornando cada vez mais popular no estudo dos lipídeos (ALEXANDRI et. al., 2017).

A RMN feita em hidrogênios oferece várias informações úteis sobre os diferentes tipos de prótons presentes em lipídeos numa amostra de alimento. Ela se mostra eficiente não apenas em análises de lipídeos não-degradados, como também em estudos de degradação destes, sendo

então utilizada para checar a evolução da degradação destes lipídeos quando expostos a condições degradativas. Assim, a RMN é um método eficiente para o acompanhamento de determinados processos de degradação de alimentos, oferecendo mais informações em relação a estes, tanto de forma qualitativa, como quantitativa (MARTÍNEZ-YUSTA et. al., 2014).

A espectroscopia de massas (MS) evoluiu durante os últimos anos, com suas aplicações invadindo vários pontos dos estudos da vida e da saúde. Este processo se dá pela formação de íons em fase gasosa (sejam eles cátions ou ânions) que podem ser isolados elétrica ou magneticamente, baseados numa medida de massa-por-carga (m/z). Num espectro de MS, se observa então os valores de m/z no eixo X e a contagem iônica no eixo Y. Uma análise realizada em MS pode apresentar informações relevantes a cerca do analito, como estrutura e composição (ANEED et al., 2009).

Ao se observar a sensibilidade da MS, começaram então estudos se utilizando a MS em conjunto com técnicas de cromatografia. A cromatografia líquida (LC) utilizada com MS é muito utilizada em análises direcionadas e não-direcionadas de substâncias. Em casos de análises não-direcionadas, o teste de LC-MS é realizado com colunas cromatográficas de fase-reversa antes de passar pelo espectrômetro de massas. O diâmetro destas colunas é um fator a ser considerado, pois colunas mais finas apresentam maior sensibilidade, mas em troca perdem um pouco da robustez e da resolução do espectro cromatográfico (PLUMB et al., 2002; TOLSTIKOV et al., 2003; PLUMB et al., 2006; LAI et al., 2009).

Uma vantagem do uso da cromatografia líquida no lugar de cromatografia gasosa (GC) acoplada ao espectrômetro de massas se dá pelo maior número de metabólitos que podem ser analisados sem necessidade de derivatização, o que geral um perfil mais global, com as substâncias mais intactas. Além disso, a LC-MS é mais sensível que a RMN, mas não sem limitações, visto que não existe no momento uma coluna que separe perfeitamente todos os

metabólitos de uma substância analisada. Isso ocorre, pois, o metabólito pode não ser retido na coluna ou possuir ligação forte demais para que seja feita devida separação. Uma outra limitação se dá na identificação destes metabólitos, pois diferente da GC-MS, a LC-MS não apresenta ainda grandes bases de dados que podem ser consultados para devida identificação, não tendo chegado neste nível de consistência (VIANT & SOMMER, 2012).

Em lipídeos, uma análise de LC-MS se inicia com a extração dos lipídeos seguida de separação por LC, realizada de acordo com a espécie lipídica ou com a classe lipídica. Assim que a amostra for devidamente separada por cromatografia, as moléculas são ionizadas e passadas por um analisador de massas, onde são detectadas. Isto ocorre de forma não-específica (com um espectro completo do analito), ou direcionada (baseado no perfil iônico da substância procurada). As informações obtidas então são analisadas com foco na identificação e semi-quantificação dos íons detectados, tendo como resultado um gráfico de picos contendo o valor de m/z , o tempo de retenção de cada substância detectada e a intensidade do pico. Análises realizadas com lipídeos por este método geralmente cobrem as espécies de fosfatidilcolinas, fosfolipídeos, di e triacilgliceróis, e ceramidas. Apesar disso, isômeros são difíceis de distinguir por este método, então ao apresentar resultados, eles são mostrados apenas como um isômero (IGLESIAS et. al., 2009; CAJKA & FIEHN, 2014).

2.8 Ação antibacteriana e antifúngica de óleos

Novos compostos que possam apresentar atividade antibacteriana e antifúngica próxima à encontrada nos produtos atuais, mas com menor toxicidade e com maior eficiência frente às resistências de fungos e bactérias patogênicos. Existem diferentes métodos utilizados para se avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos óleos e extratos, como difusão em ágar por poço, disco-difusão, entre outros (BONA et al., 2014).

Destes estudos, se obtêm novas informações a cerca de possíveis novos compostos a serem utilizados, como por exemplo os óleos de origem animal. O estudo realizado por Silva et. al., 2011, utilizou óleos de plantas e animais frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Candida albicans*. Foi constatado que o óleo de sapo-boi apresenta atividade tanto antibacteriana quanto antifúngica em relação a todas as cepas utilizadas. Não apenas ele, mas óleo de peixe também apresentou atividades antibacterianas, porém não antifúngica. Mesmo assim, a concentração mínima de inibição do óleo de sapo-boi é bem menor que a observada no óleo de peixe, onde para inibição de *S. aureus* é necessário apenas 4,4 mg/ml de óleo de sapo-boi, enquanto a de óleo de peixe é de 35 mg/ml.

Dentre os óleos animais que foram estudados para analisar possível atividade biológica, Falodun et.al., 2008, analisou o óleo de jiboia (*Boa constrictor*) quanto a seu potencial antibacteriano e antifúngico, pelo método de difusão em ágar, frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus ssp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* e *Candida albicans*. De acordo com os autores, o óleo deste réptil apresenta atividade em bactérias Gram-positivas, visto que foi observado presença de halo de inibição em placas de *S. aureus*, *B. subtilis* e *Streptococcus*. Infelizmente, não foi observado atividade antifúngica ou antibacteriana quanto às outras espécies estudadas. Porém, o estudo também analisou a concentração mínima inibitória para as espécies que se apresentaram sensíveis ao óleo, onde *S. aureus* e *Streptococcus* são sensíveis a diluições de até 1/16, e *B. subtilis* é sensível a diluições de até 1/8. Um outro ponto analisado foi um comparativo entre antibióticos comerciais e o óleo de jibóia, em que o de origem animal apresentou potencial semelhante a amoxicilina, com ambos apresentando halos de inibição de cerca de 15mm nas três espécies sensíveis.

2.9 Propriedades antioxidantes dos óleos

Uma substância com propriedade antioxidante é basicamente aquela que em concentrações não tão elevadas, pode desacelerar ou até prevenir o processo de oxidação de um substrato. Para que uma substância seja considerada um bom antioxidante, ela precisa atender a alguns critérios, como capacidade quelante de metais relacionados ao processo oxidativo, apresentar doadores de elétrons ou de hidrogênio a radicais livres e acesso ao local de ação para que ocorra a atividade antioxidante (Figura 6). Estes compostos agem em várias etapas do processo de oxidação, onde eles podem reduzir os níveis de oxigênio livre, o que evita o início do processo de oxidação, além de agir quelando íons metálicos presentes e podendo decompor alguns produtos, os tornando compostos que não são radicais livres. Dentre os compostos naturais considerados antioxidantes, podemos encontrar algumas vitaminas, carotenóides e compostos fenólicos (SUCUPIRA et.al., 2012).

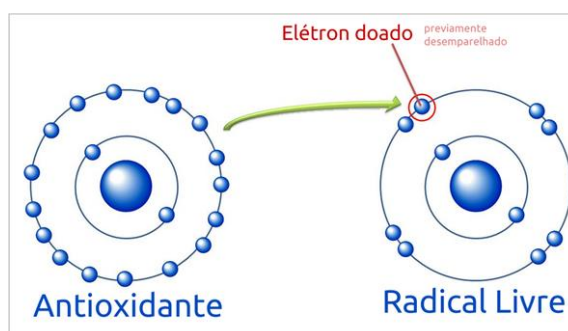


Figura 6-Ação de antioxidante sobre radical livre.

Fonte: Retirado de: <<https://radicaislivres97.wordpress.com/2013/05/26/introducao-aos-antioxidantes/>>. Acesso em: 10 de agosto de 2018

Carotenóides são uma família de substâncias que agem como pigmentos naturais de plantas, como o β -caroteno, um precursor da vitamina A. Eles são espécies reativas a oxigênio, o que faz com que possam proteger a pele de processos oxidativos. Nas plantas, eles agem junto com a clorofila no processo de fotossíntese, o que os torna essenciais em processos fisiológicos destas. A ação dos carotenóides se dá pela captura de radicais de oxigênio singlete e de radicais peróxila, sendo considerados ótimos inativadores destes radicais. Para agir contra os oxigênios singletes, os carotenóides fazem um processo de transferência de energia, que vai dos oxigênios

para eles. Quanto aos radicais peroxila, eles o sequestram através de interações químicas. Devido ao seu caráter lipofílico, eles também agem como antioxidantes frente a lipoproteínas LDL e HDL (RODRIGUEZ-AMAYA & KIMURA, 2004; PODSEDEK, 2007).

O ácido ascórbico, ou vitamina C, é um ótimo sequestrador de radicais livres, sendo considerado um dos melhores antioxidantes naturais, devido a sua alta capacidade sequestrante e baixa toxicidade. Dentre os radicais que sequestra, temos ânions superóxidos, peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete. Também age impedindo reações de anitrosação demoléculas, ao agir sobre o nitrogênio quando se encontra em soluções aquosas. No organismo, age protegendo os tecidos, as membranas celulares e o DNA de possíveis danos oxidativos (WEBER et.al., 1996; WU et.al., 2017).

A vitamina E faz parte do grupo de vitaminas lipossolúveis, onde a forma mais abundante e biologicamente ativa é o α -tocoferol, sendo utilizada em alguns processos do metabolismo humano. A vitamina E age protegendo danos a pele por radiações UVB ao impedir a formação de espécies reativas de oxigênio, assim como agindo como sequestrante de radicais livres. Dessa forma, a vitamina E pode auxiliar estabilizando a superfície e a membrana das células e reduzindo o número de células apoptóticas (MAALOUF et.al., 2002; JIANG, 2014).

Os compostos fenólicos são um grupo de substâncias de origem natural, sendo obtidos através da alimentação. São formados por pelo menos um anel aromático unido a uma ou mais hidroxilas (Figura 7). Seu papel como agentes antioxidantes é grande, ao combaterem radicais livres doando um átomo de hidrogênio proveniente de uma de suas hidroxilas e quelando metais como Fe^{2+} e Cu^+ . Além disso, os compostos fenólicos interrompem a cadeia de propagação de radicais livres em reações de oxidação lipídica e tem capacidade de reparar danos causados por oxidação em moléculas. Os metabólitos obtidos após ação destes compostos são considerados estáveis devido ao anel aromático neles presente (SOARES, 2002; KARAKAYA, 2004; KYNGMI & EBELER, 2008).



Figura 7-Exemplo de composto fenólico.

Fonte: Retirado de: <<https://www.infoescola.com/quimica/fenolis/>>. Acesso em: 01 de dezembro de 2018.

2.10 Propriedades anti-inflamatórias dos óleos

Inflamação é uma palavra derivada de “estar inflamado”. Inflamar, por sua vez, significa “colocar fogo”, apontando para a cor avermelhada e dor presentes nesse processo. No nosso organismo, a resposta inflamatória se apresenta como um complexo mecanismo para defesa contra infecções, além de tentativa de reparação de danos teciduais, ou mesmo até perda de função, buscando o equilíbrio homeostático (TROWBRIDGE & EMLING, 1997; LAWRENCE et al., 2002; RIOS et al., 2009).

Estas reações inflamatórias se caracterizam por um aumento de fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular, ocorrendo então concentração de células e dilatação dos vasos sanguíneos, revelando os cinco sinais da presença de inflamação: rubor (hiperemia), tumor (edema), calor (aumento da temperatura local), dor e por último, perda de função (ROCK & KONO, 2008).

São várias as células que migram para os tecidos em casos de inflamações, como neutrófilos, os macrófagos, eosinófilos, dentre outras. Estas células são responsáveis pela produção de mediadores do processo inflamatório, como óxido nítrico (NO), serotonina, histamina, fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas (ILs), eicosanoides (produtos do processamento do ácido araquidônico –AA) como as prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs), fator de ativação plaquetária (PAF), ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), quimiocinas e várias

proteases. A óxido nítrico sintase (NOS) induz a liberação de óxido nítrico (NO) devido a infiltração celular. Essa NOS é uma mediadora e reguladora presente em casos de diabetes, artrite reumatoide e esclerose múltipla (KASSUYA & PIUBELLI, 2013; DZOYEM & ELOFF 2015).

Vários são os estudos que apontam para atividade anti-inflamatória de produtos de origem animal utilizando o método de edema em ratos. Pesquisas utilizando óleo e gorduras de emu (*Dromaius novaehollandiae*) e de jibóia com 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA) como agente inflamatório encontraram inibição de 70% e de 65% de edema, respectivamente. Além disso, testes com óleo de teiú (*Tupinambis merianae*) tendo como agentes inflamatórios TPA, AA e fenóis apontaram os ácidos graxos como possuidores de atividade anti-inflamatória por interferirem com a via de inflamação do AA e seus metabólitos (YOGANATHAN et. al., 2003; FALODUN et. al., 2008; FERREIRA et al.,2010).

Ácido oleico é apontado como sendo capaz de modular respostas inflamatórias e imunes em danos na pele, sugerindo que ácidos graxos monoinsaturados ômega 9 podem ser úteis no tratamento de ferimentos cutâneos, principalmente quando se tratam de casos de queimaduras. Além disso, ácidos graxos geram uma substituição parcial na membrana plasmática do AA, o que desencadeia uma queda nos níveis de AA e, conseqüentemente, redução na resposta inflamatória, visto que ocorre redução nos níveis de eicosanoides oriundos do processamento do AA. O ácido linoleico também é apontado como inibidor de enzimas COX-1 e COX-2, levando a níveis mais baixos de IL-1 e IL-6 (RINGBOM et. al., 2001; HENRY et. al., 2002; CALDER, 2005; ZHAO et. al., 2005; CARDOSO et. al., 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o potencial químico e tecnológico do óleo de jacaré para uso na produção de nutracêuticos.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o óleo de jacaré por índice de acidez e peróxidos por 90 dias;
- Determinar perfil lipídico do óleo de jacaré por RMN e HPLC-APCI-MS;
- Avaliar potencial propriedade antifúngica, antibacteriana, antioxidante e antiinflamatória do óleo de jacaré.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção da matéria-prima

A amostra de óleo de jacaré foi obtida de produto adquirido comercialmente em rede de varejo, proveniente de área de manejo, em embalagem original de 1kg.

4.2 Caracterização de óleo de jacaré

O óleo de jacaré foi caracterizado por testes de índice de acidez e índice de peróxidos, de acordo com as metodologias da AOAC (2016). Os testes foram realizados durante um período de 90 dias, no qual amostras do óleo foram armazenadas em 3 ambientes diferentes: geladeira (8°C), temperatura ambiente (25°C) e estufa (45°C). As leituras foram realizadas nos dias 1, 30, 60 e 90, em cada amostra.

4.2.1 Índice de acidez

Foram pesados cerca de 2 g do óleo em frasco Erlenmeyer de 125 mL. Foram adicionados 25 mL de solução de éter-álcool (2:1) v/v neutra, seguido de duas gotas de fenolftaleína, como indicador. A titulação foi realizada com solução de hidróxido de sódio 0,1 M previamente padronizada até o aparecimento da coloração rósea, devendo persistir por 30 segundos. Este teste foi feito em triplicata. O cálculo foi realizado conforme Equação 1.

Equação 1- Índice de acidez

$$\text{Índice de acidez} = \frac{V \times f \times 5,61}{P}, \text{ onde:}$$

v = nº de mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M gasto na titulação

f = fator da solução de hidróxido de sódio

P = nº de g da amostra (AOAC, 2016).

4.2.2 Índice de peróxidos

Foram pesados cerca de 5 g de óleo de jacaré em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, no qual foram adicionados 30 mL de solução ácido acético-clorofórmio 3:2 v/v, sendo em seguida agitados até dissolução da amostra. Em seguida, se adicionam 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio e se deixa em repouso ao abrigo da luz por 1 minuto. Foram então acrescentados 30mL de água e foi realizada titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,01N previamente padronizada, com agitação constante. A titulação continuou até o quase desaparecimento da coloração amarela, quando foram adicionados 0,5 mL de solução de amido indicadora e a titulação continuou até completo desaparecimento da cor azul. Um branco foi preparado nas mesmas condições. Este teste foi feito em triplicata. O cálculo foi realizado de acordo com a Equação 2.

Equação 2- Índice de peróxidos

$$\text{Índice de peróxidos} = \frac{(A - B) \times N \times f \times 1000}{P}, \text{onde:}$$

A = nº de mL da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra

B = nº de mL da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco

N = normalidade da solução de tiosulfato de sódio

P = nº de g da amostra (AOAC, 2016).

4.3 Perfil lipídico do óleo

O perfil lipídico do óleo foi realizado utilizando RMN e HPLC-APCI-MS, com o intuito de não apenas analisar os ácidos graxos que o compõem, como também determinar os triacilgliceróis (TAGs) nele encontrados.

4.3.1 Análise em RMN

As análises foram realizadas utilizando uma alíquota de 30 mg de óleo solubilizada em 600 μL de CDCl_3 para análise por RMN de ^1H . As análises qualitativas e quantitativas foram realizadas em quintuplicata empregando RMN AVANCE III 11,74 T, BBO SMARTPROBE® {ZG: P1 9.975 μs , PLW9 $7.183 \cdot 10^{-5}$ W, D1 3.63 s [7xT1 do glicerol ($\text{H}\alpha$, δ 4.27, *dd*)], e quinina ($\text{H-2}'$, δ 8.66, *d*) como padrão de referência externa (6.0 mM) para o cálculo via ERETIC}. As linhas de base e fases do espectro de RMN de ^1H das amostras foram automaticamente corrigidas utilizando o TOPSPIN 4.1. As atribuições foram confirmadas comparando-as com os valores de RMN de ^1H com os existentes na literatura. Os teores dos resíduos de ácido graxos obtidos via ERETIC foram comparados com o método descrito na literatura (BARISON et. al., 2010).

4.3.2 Análise de TAGs por HPLC-APCI-MS

As análises foram realizadas seguindo a metodologia de Fanali et. al., 2011, com modificações. Foi utilizado um equipamento HPLC, com bomba Accela 600, detector Surveyor, todos da Thermo Scientific acoplado a um espectrômetro de massa TSQ Quantum Access, da Thermo Scientific. Foi utilizada uma coluna C18 (150 mm x 5,0 mm x 2.7 μm). O fluxo da fase móvel foi de 1mL/min, utilizando acetonitrila (A) e isopropanol (B) de acordo com o seguinte gradiente linear: 0 min, 0% B; 40 min, 70% B; 50 min, 70% B; e 56min, 0%B. O volume de injeção foi de 2 μL , com as análises ocorrendo a temperatura ambiente.

Os parâmetros utilizados para o APCI-MS foram: APCI modo positivo; alcance de massa espectral de 250-1200 m/z; intervalo de 0.5 s; velocidade de escaneamento 2143 amu/s; fluxo do gás de nebulização (N_2), 4.0 mL/min; temperatura do APCI, 400 $^\circ\text{C}$; heat block, 230 $^\circ\text{C}$; temperatura da linha de desolvatização (DL), 250 $^\circ\text{C}$; voltagem da DL, -34 V; voltagem da sonda, +4.5 kV; voltagem Qarray, 1.0 V; voltagem do detector de fluorescência, 90 V; e ganho de detecção, 1.05 kV.

4.4 Análise de potencial antifúngico do óleo

Para o potencial antifúngico do óleo, foi utilizada cepa CFAM-1186, de *Candida albicans*, cedido pela FIOCRUZ, pelo método de disco difusão em meio sólido. As cepas, mantidas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) a uma temperatura de 4 °C, foram repicadas em nova placa de ASD e incubadas a 35 °C. Foi preparada suspensão de cultura, diluída em solução salina 0,85% de acordo com turbidez da escala de 0,5 de McFarland, que foi então inoculada na superfície de placas com meio de cultura ASD, utilizando um suabe. 20µl do óleo de jacaré foram então aplicados em discos de papel filtro (n° 103) medindo 6 mm de diâmetro, nas seguintes concentrações: 100%, 50% e 25%, com diluições realizadas com dimetilsulfóxido (DMSO), e 50% com diluição realizada com clorofórmio. Para os controles, foram utilizados os reagentes utilizados para diluição, e disco de antibiótico com cetoconazol. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas, e após término do período de incubação, foi observado presença ou ausência de halo de inibição do crescimento fúngico, sendo estes medidos em milímetros (SILVA et.al, 2016).

4.5 Análise de potencial antibacteriano do óleo

Para o potencial antibacteriano do óleo, foi utilizada cepa CBAM-0324, de *Staphylococcus aureus*, cedido pela FIOCRUZ, pelo método de disco difusão em meio sólido. As cepas foram repicadas em placas de ágar sangue e incubadas a 35 °C. Foi preparada suspensão de cultura, diluída em solução salina 0,85% de acordo com turbidez da escala de 0,5 de McFarland, que foi então, com uso de um suabe, inoculada na superfície de placas com meio de cultura ágar Muller Hinton. 20µl do óleo de jacaré foram então aplicados em discos de papel filtro (n° 103) medindo 6 mm de diâmetro, nas seguintes concentrações: 100%, 50% e 25%, com diluições realizadas com dimetilsulfóxido (DMSO), e 50% com diluição realizada com clorofórmio. Para os controles, foram utilizados os reagentes utilizados para diluição, e disco de

antibiótico com vancomicina. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas, e após término do período de incubação, foi observado presença ou ausência de halo de inibição do crescimento bacteriano, sendo estes medidos em milímetros (BONA et.al., 2014).

4.6 Análise de potencial antioxidante do óleo

4.6.1 Cultivo celular

Foi utilizada linhagem celular de fibroblasto (MRC-5), pelo método de Wee et. al., 200, com modificações, onde estas células foram mantidas em garrafas de polipropileno, com meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF, Gibco by Life Technologies) e 50 µg/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco by Life Technologies), em estufa umidificada a 37° C e 5% de CO₂. O crescimento celular foi acompanhado diariamente, com auxílio de microscópio ótico invertido e a troca do meio de cultivo foi realizada sempre que o limite de confluência das células tinha atingido ao volume esperado, ou na necessidade de reposição de nutrientes. Para a manutenção da linhagem celular foi utilizada uma solução de tripsina EDTA a 0,25% (Gibco by Life Technologies) para destacar as células das garrafas de cultura.

4.6.2 Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da atividade citotóxica do óleo de jacaré foi realizada em linhagens de fibroblastos (MRC-5). Esse teste foi feito por meio do ensaio Alamar Blue®, segundo metodologia descrita por Ahmed et. al., 1994. As células foram semeadas na concentração de 0,5 x 10⁴ células/poço em microplacas de 96 poços. As células foram tratadas com o óleo de jacaré nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL, 12,5µg/mL, 6,25µg/mL (triplicata). Após 24 horas de tratamento, 10µL da solução de Alamar Blue® 0,4% foi adicionada em cada poço das placas, e após 3 horas de incubação foi feita a leitura da absorbância em leitor de microplacas Elisa na faixa de 540 nm excitação e 585 nm de emissão (DTX800 Beckman e Coulter). Os

valores obtidos foram então calculados e organizados em gráfico, onde valores acima de 50% indicam não haver citotoxicidade considerável.

4.6.3 Avaliação de atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante celular foi realizada utilizando a metodologia descrita por Wolfe & Liu, 2007, na qual baseia-se na detecção da produção de espécies reativas a oxigênio (ROS) intracelular utilizando o composto fluorescente: 2',7'-dicloro-fluoresceína-diacetato (DCFH-DA). Nesta técnica, foram utilizadas células da linhagem MRC-5, que foram semeadas na concentração de 6×10^4 células/poço, em microplacas de 96 poços, onde foi adicionado 100µL de meio de crescimento nos poços das placas e incubados por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com PBS. Em seguida, foi preparada uma solução a 25µM de DCFH-DA dissolvida em tampão Hank's e o óleo de jacaré foi adicionado juntamente com essa solução nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL, 12,5µg/mL, 6,25µg/mL. Foram adicionados 100µL dessa diluição aos poços da placa e foram incubados durante 60 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, os poços foram lavados novamente com PBS, e logo em seguida foi preparada uma solução de 2,2'-azobis amidinopropano (AAPH) a 600µM dissolvida em tampão Hank's, 100µL dessa solução foi adicionada aos poços e em seguida foi realizada a leitura da placa com a fluorescência em leitor de microplacas Elisa (DTX800 Beckman e Coulter) mensurada imediatamente no comprimento de onda de excitação 485nm e de emissão 520nm durante 60 minutos em intervalos de 5 minutos. Os controles com e sem DCFH-DA foram preparados e submetidos a processos análogos. Quercetina foi utilizada como controle positivo da atividade antioxidante.

4.7 Análise de potencial anti-inflamatório do óleo

4.7.1 Avaliação da citotoxicidade

Foi realizado ensaio colorimétrico de Brometo tiazolil azul de tetrazólio (MTT) segundo a metodologia de Mosmann (1983), que se baseia na redução enzimática de MTT formando cristais de formazan por ação da mitocôndria e enzimas desidrogenases celulares. Células de macrófagos murino J774A.1 foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/poços em placas de 96 poços e deixadas em incubadora de CO₂ a 37°C por 24 h, e após esse período as células foram expostas as concentrações de 10, 20 e 50 µg/mL do óleo de jacaré por 24 h. Então, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com 100 µL de PBS 0,1 M com pH 7.4, em seguida adicionado 100 µL de MTT (1:1 mg/mL) diluído em meio de cultura RPMI 1640 e incubado por 3 h a 37°C. As células foram então ressuspensas com DMSO:isopropanol (1:1) em cada poço e as placas foram levemente agitadas em agitador orbital por 15 minutos a temperatura ambiente para solubilização dos cristais de formazan formados da reação de MTT com enzimas mitocondriais em células viáveis.

A densidade óptica dos poços foi medida em leitor de microplaca (DTX 800, Beckman Colter) em 570 nm e os valores de absorbância das células tratadas com o óleo de jacaré foram comparados com os valores de absorbância obtidos a partir das células controle sem tratamento. Como controle positivo foi utilizado indometacina e células sem lipopolissacarídeo (LPS) como controle negativo do experimento.

4.7.2 Inibição da ativação de macrófagos

Células de macrófago murino J774A.1 foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/poço em placa de 96 poços. Após o tempo de incubação de 24 h das células a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, o meio foi retirado e adicionado meio RPMI suplementado com 1% de SBF com volume final de 100 µL/poço, sendo em seguida estimuladas com 1 µg/mL de LPS

extraído de *Escherichia coli* e tratadas com os óleo de jacaré nas concentrações de 10, 20 e 50 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado meio RPMI 1640 enriquecido com LPS e como controle negativo meio RPMI 1640 sem LPS. As células foram incubadas por 24 h a 37°C, 5% de CO₂, e o sobrenadante celular foi coletado para a análise de óxido nítrico NO[•] (GREEN et al., 1982).

4.7.3 Quantificação de nitrito

O óxido nítrico (NO[•]) produzido foi mensurado pela concentração de seus produtos de degradação, os nitritos, utilizando reagente de Griess. O nitrito reage com sulfanilamida em meio ácido, formando sal de diazônio, que reage com naftil-1-etilenodiamina, dando origem a um composto azo estável de coloração púrpura, que é quantificado por espectrofotometria a 550 nm (GREEN et al., 1982).

Para a determinação da produção de óxido nítrico, 50 µL do sobrenadante celular foi submetido à reação com 50 µL do reagente de Griess (sulfanilamida + naftil), preparados utilizando soluções estoque de naftil-1-etilenodiamina 0,1% dissolvido em água destilada e de sulfanilamida a 1% dissolvida em ácido fosfórico H₃PO₄ a 5%, na proporção 1:1. Após o período de incubação por 15 minutos as amostras foram lidas em leitor de microplaca (DTX 800, Beckman Colter) a 560 nm. O cálculo das concentrações de nitrito foi realizado com base em curva padrão utilizando diferentes concentrações de nitrato de sódio NaNO₃ 15 µM até 1000 µM.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do óleo de jacaré

O óleo de jacaré foi analisado nos dias 1, 30, 60 e 90 quanto ao seu índice de acidez e de peróxidos. Durante este tempo, foi possível notar alteração visual na cor do óleo, principalmente na amostra em estufa (Figura 8).



Figura 8- Óleo de jacaré no início dos testes, e após 90 dias, em ambientes diferentes.

Das três amostras, a em estufa apresentava forte odor de rancificação já após os primeiros 30 dias, se tornando bem mais intenso ao fim dos 90 dias de experimento. Este é um processo normal e comumente ocorre em óleos e gorduras, visto que este odor vem da degradação ácidos graxos presentes neles, causada pela ação da temperatura e do tempo (DIAS & ALVES, 2013).

Aos 60 dias, o óleo em temperatura ambiente também apresentava um odor mais intenso de ranço, sendo apenas o óleo armazenado em geladeira aquele que praticamente não apresentou nenhum odor forte de degradação, mesmo após o fim do experimento.

Este perfil de odor mais intenso foi também observado por Serfert et. al., 2010, em que foram realizadas análises sensoriais de odor utilizando óleo de peixe. Os selecionados para realização de análise sensorial deste óleo caracterizaram o odor como “de peixe” e metálico, e o estudo foi realizado com óleo armazenado a 20°C, -18°C e 40°C. Ao final das análises, foi

constatado um aumento nos odores de peixe e no metálico, conforme o aumento da temperatura, onde os óleos armazenados a 40°C apresentavam maior intensidade destes odores.

5.1.1 Índice de acidez

O índice de acidez é um indicativo de processo de decomposição e aponta para a presença e quantidade de ácidos graxos livres presentes no óleo. Os valores de índice de acidez obtidos nas amostras foram organizados na tabela (Tabela 2) e gráfico abaixo (Gráfico 1).

Tabela 2- Valores dos índices de acidez (em mg KOH/g) obtidos nas amostras em ambientes diferentes, durante 90 dias.

DIAS	ACIDEZ GELADEIRA (8°C)		ACIDEZ AMBIENTE (25°C)		ACIDEZ ESTUFA (45°C)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
1	3,70	0,16	3,70	0,16	3,70	0,16
30	3,41	0,15	3,97	0,16	5,18	0,15
60	3,90	0,15	4,77	0,15	5,54	0,02
90	4,05	0,16	5,13	0,15	5,89	0,15

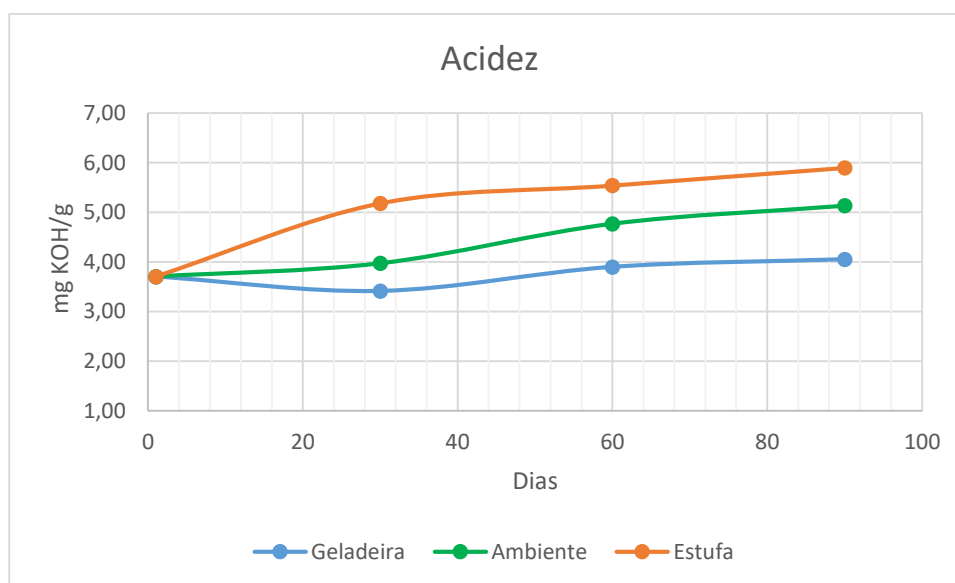


Gráfico 1- Índices de acidez em mg KOH/g das amostras de óleo em 3 ambientes diferentes, durante 90 dias.

O índice de acidez observado foi inicialmente de 3,70 mg KOH/g, valor maior do que os encontrados por Kluczkovski, 2017, que chegaram a apenas 2,39 mg KOH/g. Ao comparar com óleos de pescados, Barreto et. al., 2007, encontrou índices de acidez de 1,57 mg KOH/g em óleo de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Não há legislação brasileira para óleos e gorduras animais no que diz respeito a controle de qualidade, mas se comparado a valores apontados pela RDC N° 270, de 2005, o índice de acidez não poderia ser maior que 4,0 mg KOH/g. Diante disso, o óleo de jacaré ainda se encontrava dentro do limite apontado pela legislação ao início dos testes.

Os valores obtidos indicam que o óleo analisado pode ter sofrido ação do calor e luz durante o transporte, pois o índice de acidez é um dos dados utilizados para determinar o estado de conservação de um óleo, seja ele de origem vegetal ou animal. O óleo entra em processo de decomposição por hidrólise, oxidação ou até mesmo fermentação, alterando a concentração de íons de hidrogênios nele presentes. Exposição ao calor e a luz aceleram este processo, sendo isto observado nos valores obtidos dos óleos analisados, onde os valores mais altos de acidez foram encontrados na amostra armazenada em estufa, exposta a temperaturas de cerca de 45°C. A decomposição do óleo então quebra as ligações entre o glicerol e os ácidos graxos, formando então ácidos graxos livres que são detectados pelo teste (LUTZ, 2008).

5.1.2 Índice de peróxidos

O índice de peróxidos está relacionado ao grau de oxidação de um óleo, detectando o nível de rancidez do óleo analisado. Os valores de índice de peróxidos obtidos nas amostras foram organizados na tabela (Tabela 3) e gráfico abaixo (Gráfico 2).

Tabela 3- Valores dos índices de peróxidos (em mEq /Kg) obtidos nas amostras em ambientes diferentes, durante 90 dias.

DIAS	PERÓXIDOS GELADEIRA (8°C)		PERÓXIDOS AMBIENTE (25°C)		PERÓXIDOS ESTUFA (45°C)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
1	24,42	0,46	24,42	0,46	24,42	0,46
30	21,67	0,40	50,51	0,25	76,66	0,31
60	29,39	0,33	135,87	0,38	96,49	0,22
90	30,49	0,32	105,42	0,27	77,80	0,79

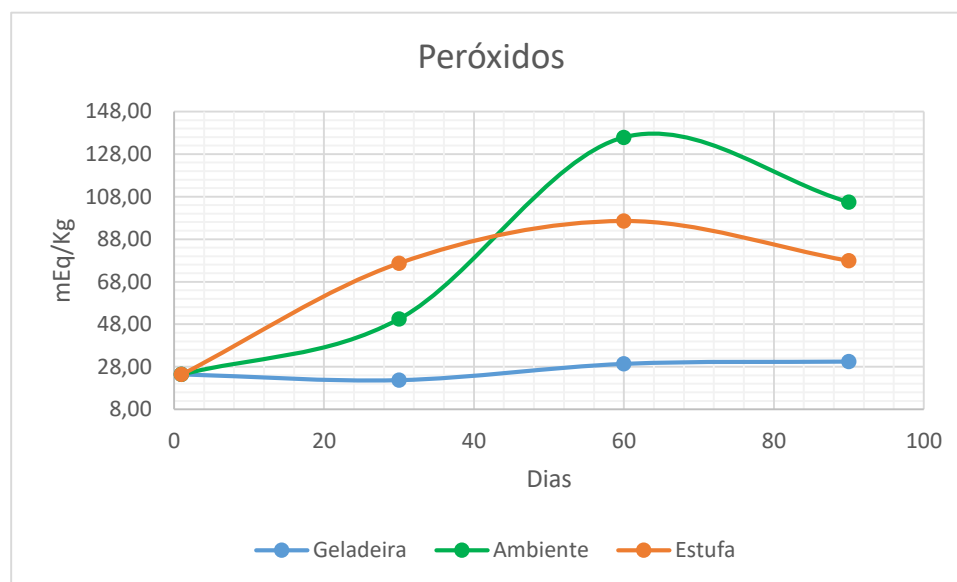


Gráfico 2- Índices de peróxidos em mEq/Kg das amostras de óleo em 3 ambientes diferentes, durante 90 dias.

Considerando o valor máximo da legislação brasileira (BRASIL, 2005) de 15 mEq/Kg, os índices de peróxidos observados foram elevados, apontando para degradação da amostra, provavelmente em função de má condição e transporte da matéria-prima. Mesmo na análise do dia 1, os índices observados já foram muito mais altos do que os índices encontrados por Kluczkovski, 2017, onde os índices de óleo de jacaré foram de cerca de 6,21 mEq/Kg, quase 3 vezes menor que o índice obtido nos testes realizados. Barreto et. al., 2007, e Souza et. al., 2007,

encontraram índices de peróxido de 0,0 em amostras de tabaqui e aracú-cabeça-gorda, respectivamente, o que aponta para óleo bem conservado e fresco.

Outro ponto observado foi a queda nos níveis de peróxido do dia 60 ao 90. Os níveis do ambiente foram mais elevados do que os da estufa provavelmente pois os peróxidos da amostra em estufa já haviam degradado e dado origem a outros compostos, enquanto a amostra em temperatura ambiente, embora já tivesse formado peróxidos, estes ainda não tinham começado a degradar e dar origem ao odor de rancidez (BELLAVÉR & ZANOTTO, 2004).

A ação da temperatura da estufa acelerou o processo de oxidação, logo os peróxidos formados não levavam tanto tempo para degradar. Isso foi constatado pelo forte odor de rancidez observado na amostra em estufa, odor que levou muito tempo para ser observado com a mesma intensidade na amostra em temperatura ambiente. A queda inicial nos níveis de peróxido da amostra em geladeira se deu, pois, os peróxidos analisados inicialmente já haviam degradado, mas devido às baixas temperaturas, o processo de oxidação ocorreu num ritmo mais lento, o que resultou em níveis bem mais baixos que os outros dois, assim como odores muito leves do processo de rancificação.

O índice de peróxidos é uma maneira simples de se detectar rancidez e degradação em óleos e gorduras. A oxidação é influenciada por diversos fatores como temperatura, luz e enzimas, formando radicais livres. Estes radicais livres entram em contato com oxigênio molecular, formando então peróxidos, que reagem com outras moléculas também oxidáveis. São formados então hidroperóxidos, e outros radicais livres. Estes hidroperóxidos dão origem a dois radicais livres, que atacam outras moléculas e vão formando mais radicais livres, numa reação em cadeia. As moléculas que se formam se rompem e dão origem a outros produtos, como aldeídos, cetonas e ésteres, produtos estes voláteis, sendo responsáveis pelos fortes odores de rancificação. Estes odores são indicativo de que a oxidação está na última etapa (BELLAVÉR &

ZANOTTO, 2004; DIAS & ALVES, 2013). Sendo os peróxidos compostos que se degradam com mais facilidade, não é incomum ver quedas em níveis de peróxido após certo tempo, assim como os observados nas amostras, pois estes já se tornaram outros compostos. Isso implica que baixos níveis de peróxido não necessariamente indicam boa estabilidade, pois os peróxidos podem já terem volatilizado ao se degradarem em composto de odores de ranço.

5.2 Perfil lipídico do óleo

O perfil lipídico do óleo foi obtido por utilização conjunta de HPLC-APCI-MS e RMN, comparando os achados com o perfil encontrado por Schmeda-Hirschmann et. al., 2014. Utilizando o HPLC-MS, foi possível traçar um perfil de triacilgliceróis (TAGs) presente no óleo de jacaré, conforme Figura 9 e Tabela 4. A escolha de se usar HPLC-MS no lugar de GC-MS foi pelo fato de não se fazer esterificação em analitos de HPLC-MS, pois a esterificação iria quebrar as ligações de ácidos graxos e glicerol, o que tornaria possível apenas a identificação dos ácidos graxos que compõem o óleo por GC, não a identificação das moléculas inteiras de TAGs ali presentes.

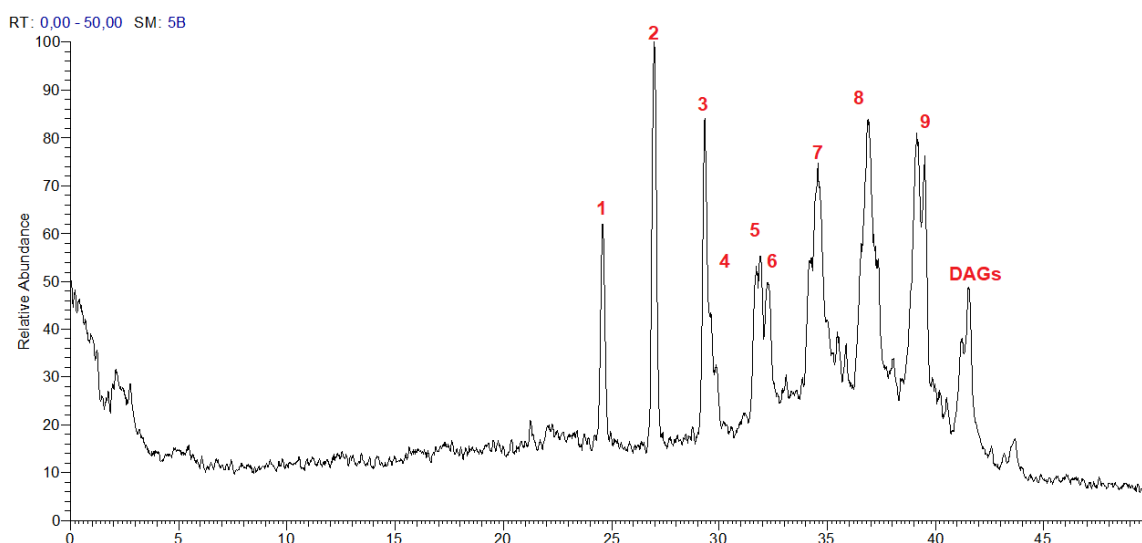


Figura 9- Cromatograma de HPLC-APCI-MS de TAGs presentes em óleo de jacaré.

Tabela 4- TAGs identificados em óleo de jacaré.

Nº	TAGS	M+H	DG+	M	DG+	M	DG+	M
1	LnLnLn	874	LnLn	595				
2	LLnLn	876	LLn	597	LnLn	595		
	OLnLn	878	OLn	599	LnLn	595		
3	LLLn	878	LLn	597	LL	599		
4	PLnLn	852	PLn	573	LnLn	595		
5	OLLn	880	OLn	599	OL	601	LLn	597
	LLL	880	LL	599				
6	PLLn	854	PLn	573	PL	575	LLn	597
	SLnLn	880	SLn	601	LnLn	595		
7	OPLn	856	OLn	599	OP	577	PLn	573
	PLL	856	LL	599	PL	575		
	OOLn	882	OO	603	OLn	599		
	SLLn	882	SLn	601	SL	603	LLn	597
8	OPL	858	OP	577	OL	601	PL	575
	PSLn	858	PS	579	PLn	573	SLn	601
9	SSLn	886	SS	607	SLn	601		

Nº: numeração de posição no cromatograma; TAGs: triacilgliceróis (L= ácido linoleico, Ln= ácido linolênico, O= ácido oleico, P= ácido palmítico, S= ácido esteárico) M+H: massa pseudomolecular do TAG; DG+: íons de fragmento de diacilglicerol; M: massa do íon de diacilglicerol fragmentado.

Foram observados 16 tipos de TAGs no óleo de jacaré, conforme sensibilidade do equipamento. Os TAGs observados são compostos por ácido linoleico (L), ácido linolênico (Ln), ácido oleico (O), ácido palmítico (P) e ácido esteárico (S) em diferentes combinações, com o pico de DAGs relacionado a diacilgliceróis que, devido às massas muito próximas, não puderam ser devidamente identificados. Como mostrado na tabela anterior, existem TAGs que não

puderam ser devidamente separadas em picos específicos. De acordo com Lída & Holcapek, 2008, e Fanali et. al., 2011, isto ocorre pois há coeluições entre eles, principalmente se for analisado o fato de que alguns TAGs apresentam o mesmo valor de m/z e podem perder uma porção semelhante de sua estrutura, tornando extremamente difícil que seja feita perfeita separação entre um e outro, como nos casos de OPLn e PLL quando estes perdem a porção P, ficando com o mesmo m/z tanto antes da perda, como depois. Além disso, não há como identificar exatamente qual isômero de cada um dos TAGs é o predominante, pois estes apresentam mesmo m/z e diferem apenas na posição em que cada ácido graxo se encontra ligado ao glicerol. Tomando como exemplo o OLnLn, não podemos dizer se este é o que se encontra em maior quantidade, ou se seriam seus isômeros LnOLn ou LnLnO, pois todos possuem o mesmo m/z não havendo como dizer em que posição estava cada ácido graxo presente. Isso faz com que, mesmo que a tabela apresente 16 TAGs, ao se levar em conta os isômeros, temos na verdade cerca de 62 TAGs diferentes. Acredita-se que esta foi a primeira vez em que foi realizada caracterização da fração de TAGs de óleo de *M. niger*.

As análises dos TAGs de um óleo ajudam a elucidar o comportamento e as propriedades físicas e funcionais deste, pois a posição dos ácidos graxos na molécula de glicerol é importante no que diz respeito ao metabolismo e ao potencial nutricional de um óleo. Isso se dá, pois, ácidos graxos ligados nas posições 1 e 3 são digeridos primeiro pela ação das lipases, dando origem a monoacilgliceróis com ligação na posição 2 e ácidos graxos livres. (HUNTER, 2001; FANALI et. al., 2011).

Um fato observado se deu pela grande quantidade de TAGs possuindo ácido linolênico em sua composição, o que levaria a crer que há grande quantidade deste ácido no óleo de jacaré. Porém, ao se analisar o óleo em RMN, foi observado o contrário, conforme Figura 10 e Tabela 5.

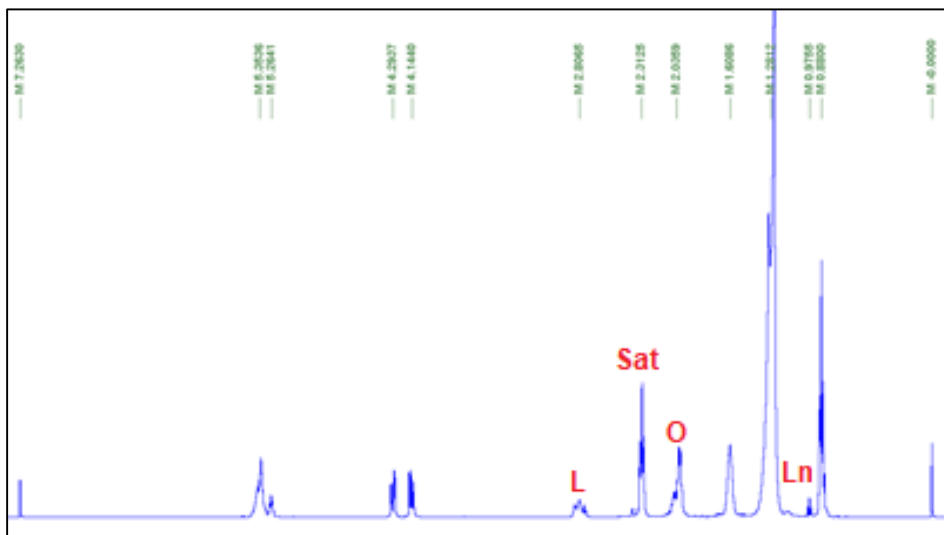


Figura 10-Espectro de ^1H RMN do óleo de jacaré. As siglas correspondem aos ácidos graxos linoléico (L), saturados palmítico e esteárico (Sat), oléico (O), e linolênico (Ln). Os outros picos são referentes aos hidrogênios do glicerol, e das cadeias carbônicas dos ácidos graxos.

Tabela 5- Índices de ácidos graxos observados no óleo, em porcentagem. As siglas correspondem aos ácidos graxos linolênico (Ln), linoléico (L), oléico (O), e saturados palmítico e esteárico (SAT).

	ERETIC		BARISON	
	% ácido graxo	Variância (%)	% ácido graxo	Variância (%)
LN	5,1	0,5	5,0	0,1
L	23,6	2,6	23,4	0,4
O	24,0	4,2	22,3	0,4
SAT	47,2	7,8	49,3	0,5

Analisando os resultados obtidos, foi observado maiores quantidades de ácidos graxos saturados, sendo que num espectro de RMN, não há como diferenciar estes ácidos graxos uns dos outros. Mesmo que se tenham observados vários TAGs contendo ácido linolênico, os resultados da RMN indicam que o ácido linolênico é o ácido em menor quantidade, o que sugere prevalência dos TAGs que não contêm ácido linolênico ou dos que contêm menor concentração dele. Quase metade dos ácidos graxos presentes nas amostras foram ácidos graxos saturados, e devido aos altos níveis destes observados em duas das réplicas pesadas, o índice de variância

observados neles foi acima de 5% na quantificação por ERETIC, algo não observado pelo método de Barison, mas ainda assim, os valores obtidos nas % de cada ácido graxo presente ainda foram bem próximos entre si, indicativo de que os valores são confiáveis.

A quantificação por ERETIC é realizada através de um sinal gerado matematicamente. Este sinal é inserido após o espectro ser obtido, servindo como referência quantitativa, sendo que a intensidade do sinal inserido varia de acordo com os sinais obtidos na amostra. A metodologia de Barison se baseia no fato de todas as cadeias de ácidos graxos que são esterificadas vêm de uma ligação com uma molécula em comum, o glicerol, e a quantificação é feita diretamente no espectro da RMN pela relação entre as áreas de sinais característicos de cada ácido graxo e o sinal do glicerol, sem o uso de equações matemáticas (BARISON et. al., 2010; WALKER et al., 2011).

Apesar disso, os ácidos graxos observados nos testes foram diferentes dos observados na pesquisa de Schmeda-Hirschmann et. al., 2014, com óleo da mesma espécie de jacaré. Eles observaram outros ácidos graxos além dos obtidos durante nossos testes. Isto pode se dar ao fato de que ele realizou o teste por GC e por GC-MS, utilizando ainda padrões conhecidos dos ácidos graxos avaliados por ele para comparação. Desta forma, eles observaram 12 ácidos graxos diferentes em sua amostra, e os nossos resultados apontaram apenas 5.

Isto pode ter ocorrido por alguns possíveis motivos: as metodologias diferentes, onde no caso de GC-MS existem bancos de dados e o uso de padrões com resultados similares aos observados em testes por este método; a sensibilidade do equipamento, o que poderia impossibilitar a detecção de níveis menores de ácidos graxos em baixas concentrações no óleo; e o próprio jacaré, visto que o animal estudado por Schmeda-Hirschmann et. al., 2014, era oriundo da Amazônia Peruana, e o do nosso estudo, da Amazônia Brasileira. Sabe-se que a alimentação influencia diretamente no perfil lipídico de um animal, então é possível que os ácidos graxos observados no jacaré dos nossos testes sejam diferentes dos observados no estudo

mencionado, pois as diferenças geográficas são indicativos de diferentes perfis alimentares, devido às diferentes espécies de animais disponíveis para a alimentação dos jacarés (INHAMUNS & FRANCO, 2001; VITOR et.al., 2016).

A espectroscopia por RMN pode também ser aplicada para se estudar a degradação oxidativa em óleos de peixe. Isso é possível pois esta técnica detecta os produtos primários e secundários da oxidação em óleos e lipídeos, além de detectar os efeitos do processamento industrial em lipídeos. Para isso, podem ser realizados análises de mudanças relativas de intensidade dos componentes principais do óleo, principalmente os ácidos graxos poli-insaturados. Um outro modo é analisando novos sinais no espectro, referentes aos componentes gerados durante a oxidação (SACCHI et. al., 2008).

5.3 Potencial antifúngico e antibacteriano do óleo

Os resultados dos testes de potencial antifúngico e antibacteriano podem ser observados nas figuras abaixo (Figura 11 e 12).

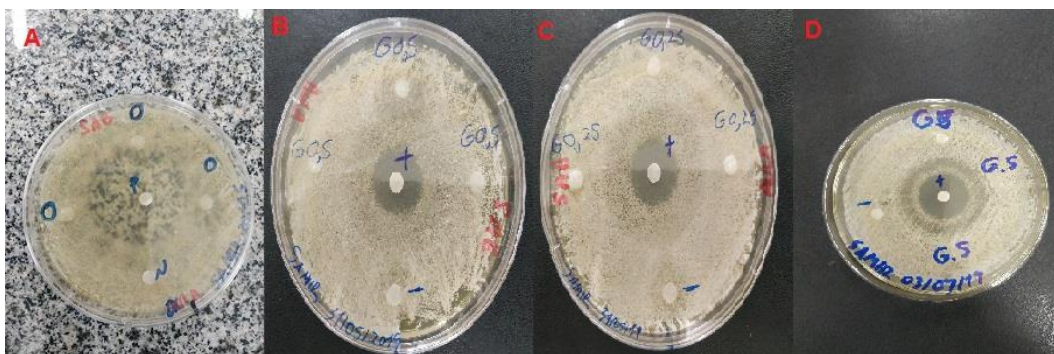


Figura 11-Testes antifúngicos.

As fotos representam cada um dos testes realizados: óleo sem diluição (A), óleo a 50% diluído em DMSO (B), óleo a 25% diluído em DMSO (C), e óleo a 50% diluído em clorofórmio (D).

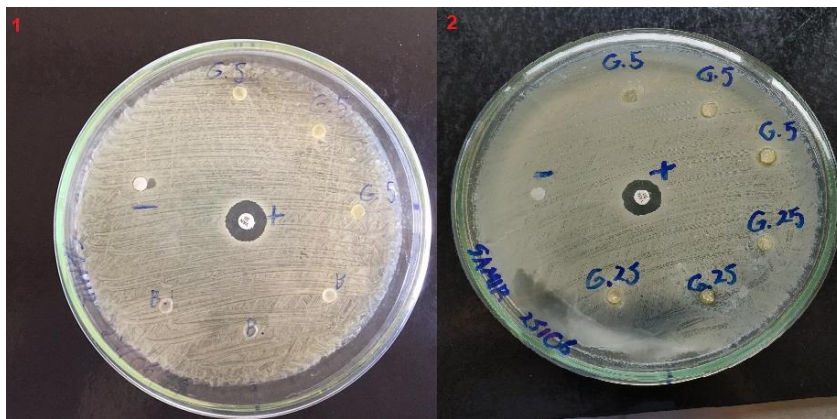


Figura 12-Testes antibacterianos.

As fotos representam os testes realizados: óleo bruto (representado por B), e a 50% diluído em clorofórmio (1), e óleo a 50% e 25% diluídos em DMSO (2).

Em nenhum dos testes realizados foi possível observar halo de inibição nos discos que foram embebidos em óleo de jacaré, indicativo de que o óleo pode não possuir nenhuma ação contra microorganismos. As diluições foram realizadas pois o ágar é um meio de cultura que se utiliza de água para o preparo. Levando em conta a viscosidade da amostra de estudo, houve a preocupação de o óleo de jacaré não conseguir se difundir devidamente pelo ágar, então a solução encontrada foi diluir este óleo tanto em DMSO como em clorofórmio e repetir o teste, para garantir a devida difusão pelo meio de cultura. Um ponto a ser levado em conta se dá no fato de que a cepa de *Staphylococcus aureus* apresentava resistência frente a alguns antibióticos, como oxacilina, sendo então necessária a utilização de vancomicina como controle. Esta resistência pode ter influenciado o resultado do teste para ação antibacteriana.

Óleos essenciais e gorduras animais vêm sendo objeto de estudo no combate contra fungos e bactérias, devido a resistência destes microorganismos frente aos antibióticos atualmente utilizados. Lima et. al., 2006, realizou testes com óleos essenciais de 6 espécies diferentes de plantas, encontrando em todas elas atividades antifúngicas frente a cepas de *Cândida*. Oliveira, 2013, realizou testes se utilizando de óleo de *Spilotes pullatus*, uma cobra de grande distribuição pela América do Sul, onde não observou atividade frente a fungos ou bactérias. Apesar disso, os testes realizados com este óleo de cobra apontaram para um efeito

potencializador da ação de gentamicina contra espécies bacterianas, se observando então que este óleo sozinho não apresenta ação contra microorganismos, mas sendo clinicamente eficaz ao ser utilizado junto a outro antibacteriano.

Apesar de não ter encontrado ação antifúngica, Falodun et. al., 2008, observou que o óleo de *Boa constrictor* apresentou, por si só, atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Streptococcus ssp*, com halos de inibição de tamanho próximo aos halos observados em discos de amoxicilina, utilizados como controle nos testes por ele realizados. Além disso, seus resultados apontaram para maior susceptibilidade de bactérias Gram positivas a ação de óleos.

Ácidos graxos como o propiônico, láurico, linoleico, oleico e esteárico são conhecidos por apresentarem ações tanto antibacterianas como antifúngicas. No caso da ação antifúngica, ácidos graxos são apontados como modificadores de condições locais, e na ação antibacteriana, afetam a síntese bacteriana endógena de ácidos graxos, o que interfere, por exemplo, na síntese da parede celular da bactéria. Mesmo assim, o exato mecanismo para essas ações ainda não foi devidamente elucidado. Os ácidos graxos insaturados são apontados como possuidores de maior ação contra estes microorganismos, principalmente em se tratando dos ácidos graxos de cadeias longas. Logo, maiores concentrações de ácidos graxos insaturados apontam para maior eficácia (NOBRE et al., 2002; ZHENG et al., 2005).

5.4 Potencial antioxidante do óleo

O óleo não apresentou efeito citotóxico, visto que todos os valores obtidos foram acima de 80% de viabilidade celular (Gráfico 3).

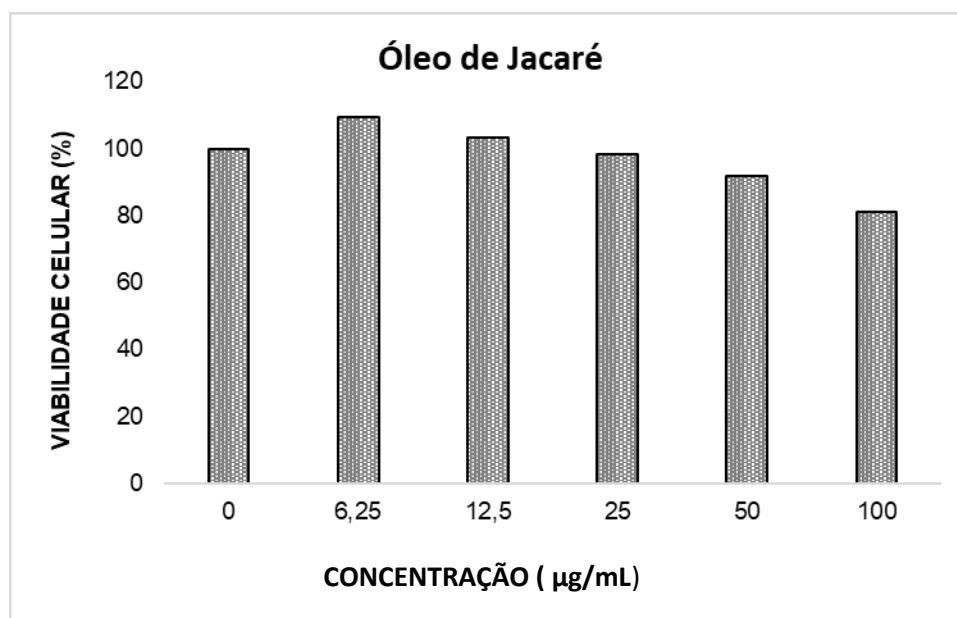


Gráfico 3- % de células viáveis após contato com óleo de jacaré em diferentes concentrações, pelo método Alamar Blue.

Estes valores indicam que não houve morte celular em altos níveis devido ao óleo, em nenhuma das concentrações analisadas. Mesmo o valor mais baixo, de cerca de 80%, indicou morte de apenas 20% das células viáveis no teste. Valores elevados, acima de 50%, são indicativo de que a substância testada é então segura para utilização. Testes de citotoxicidade são essenciais na triagem de substâncias para uso em novos produtos, avaliando a segurança destas em diferentes concentrações. O teste realizado indica que o óleo de jacaré é seguro, não apresentando caráter citotóxico.

O método de Alamar Blue envolve a adição de um indicador fluorogênico oxi-redutor em culturas de célula, onde a forma oxidada se apresenta com uma cor azul escura com pouca fluorescência. Isso muda quando se entra em contato com células, havendo oxi-redução e fazendo sua cor mudar para vermelho, com fluorescência. Assim, essa conversão pode ser quantificada e reflete a viabilidade celular. Este método é tido como vantajoso devido a alguns aspectos: ele é

simples de se usar, visto que o indicador é adicionado diretamente na cultura de células; ele não é tóxico, nem para as células e nem para o pesquisador; ele é mais barato se comparado a outras metodologias; e pode ser facilmente adaptado para testes em larga escala. (PAGÉ et. al., 1993; AHMED et. al., 1994; FRIES & MITSUHASHI, 1995; NAKAYAMA et. al., 1997).

Quanto ao potencial do óleo de jacaré como antioxidante, o teste indicou que não há este tipo de ação, conforme gráfico abaixo (Gráfico 4).

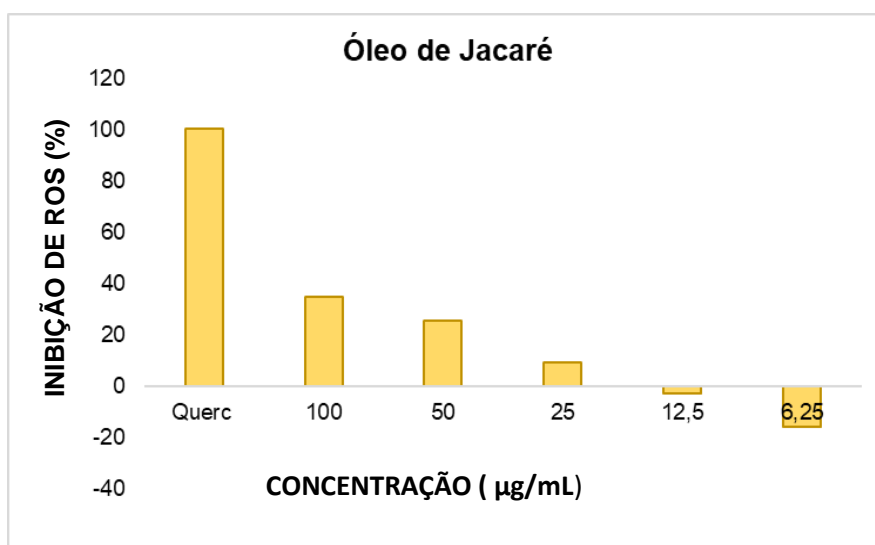


Gráfico 4- % de inibição de ROS utilizando diferentes concentrações de óleo de jacaré. A quercetina foi utilizada como controle, inibindo praticamente 100% dos ROS.

Neste teste, valores altos apontam para a inibição das ROS, indicando possível atividade antioxidante. Mesmo nas concentrações de 100µg/mL e 50µg/mL, não foi observada grande ação antioxidante, chegando apenas a 40% na concentração de 100µg/mL. Uma substância é considerada antioxidante quando esta apresenta valores acima de 50%, estando o mais próximo possível do controle, que foi a quercetina a 100µg/mL, com 100% de inibição, claro indicativo de ação antioxidante.

O uso de DCFH em testes se dá pela ativação deste através da remoção do diacetato da substância. Quando o DCFH é exposto a peróxido de hidrogênio ou soluções de peroxidase, o DCFH sofre oxidação e se torna DCF, que por sua vez, apresenta fluorescência que pode ser medida por equipamentos. Desta forma, a fluorescência é proporcional a concentração de

peróxidos de hidrogênio presentes. O AAPH é um iniciador de radicais, servindo como fonte de ação oxidativa. Radicais criados por ele podem não reagir entre si ou com oxigênio, dando origem a radicais peroxil, onde a indução criada pelo AAPH para formação de DCF em culturas de célula ocorrem de acordo com a concentração utilizada (KESTON & BRANDT, 1965; WOLFE & LIU, 2007).

Neste teste, o componente em estudo pode exercer a ação antioxidante em dois momentos: diretamente na membrana celular, quebrando a reação de formação de peróxidos logo na superfície da célula; ou ele pode ser absorvido pela célula, atravessando a parede celular e reagindo diretamente com o interior desta célula. Mas o foco deste método se dá por tentar se utilizar de um ambiente mais próximo do organismo, ao fazer as reações acontecerem em presença de células, não apenas de maneira puramente química. Mesmo não sendo com óleos animais, Silveira, 2014, realizou testes com diferentes plantas frente a diferentes metodologias de ação antioxidante (DPPH, radicais hidroxil, radicais peroxil e radicais superóxidos) e constatou diferentes taxas de atividade antioxidante em cada um dos testes, sugerindo que o fato de uma espécie possuir ação frente a um determinado radical não significa que o resultado será o mesmo quando testado com outros radicais, pois o ambiente exerce grande influência nos resultados observados.

O mesmo foi observado por Wolfe & Liu, 2007, ao se comparar valores de capacidade antioxidante dos seus testes com valores obtidos por outros pesquisadores. Nos testes realizados por eles, feitos em cultura de células para se aproximar mais do ambiente do organismo, eles encontraram maior atividade antioxidante na quercetina, kaempferol e miricetina, analisando 14 tipos diferentes de compostos antioxidantes. Porém, Ou et. al., 2001, encontrou melhores valores na quercetina, catequina e ácido caféico utilizando a metodologia de capacidade de absorção dos radicais oxigenados (ORAC), e ácido gálico e epicatequina foram os mais ativos no teste de capacidade antioxidante trolox equivalente (TEAC) realizado por Kim & Lee, 2004. Isso aponta

para o fato de que metodologias diferentes, mesmo que buscando a mesma ação, apresentam resultados diferentes, sendo muitas delas de caráter apenas químico, sem contar com o fator biológico do organismo.

Neste panorama, o óleo de jacaré não apresentou atividade antioxidante satisfatória nas concentrações utilizadas, apesar de ainda ter apresentado nível de 40%. Uma possível explicação para isso se daria pelos radicais livres terem inicialmente agido no óleo antes de começar a agir nas células presentes na placa. Logo, onde havia maior concentração de óleo, haviam mais radicais do óleo a serem ligados aos radicais peroxil presentes no teste.

5.5 Potencial antiinflamatório

Os resultados obtidos para citotoxicidade do controle e do óleo foram organizados nos gráficos abaixo (Gráfico 5).

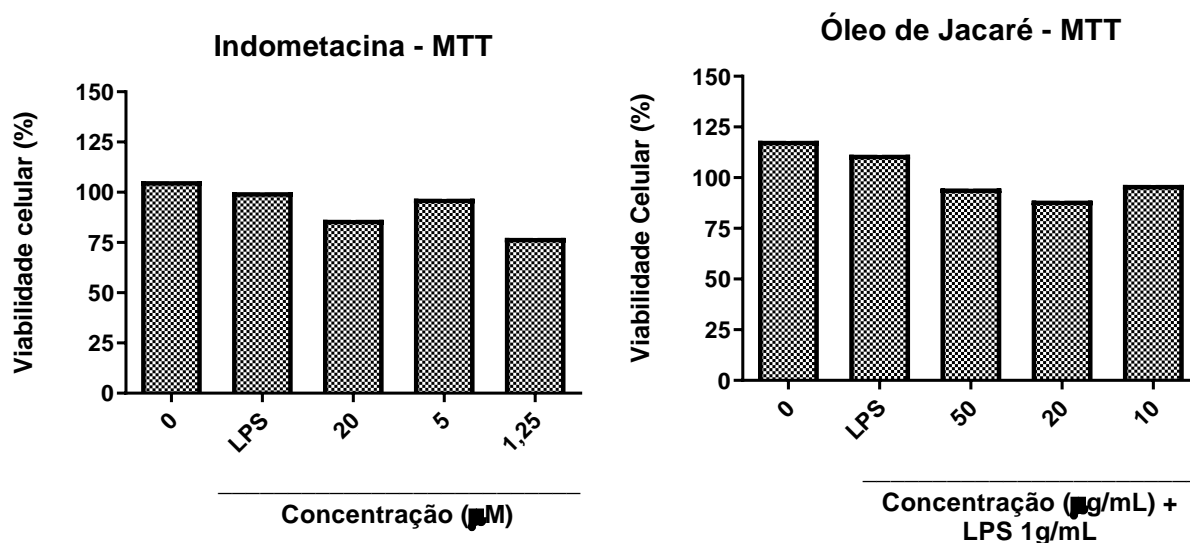


Gráfico 5- % de células viáveis após tratamento com indometacina como controle positivo, em diferentes concentrações, e com o óleo de jacaré, em diferentes concentrações.

Observando os gráficos, conclui-se que nem a indometacina nem o óleo de jacaré são tóxicos para a célula, sendo eles então seguros para uso. Os índices observados mostram níveis altos de viabilidade celular, sendo o menor para indometacina de 77%, e o menor para o óleo de 88%. Índices acima de 50% são considerados aceitáveis, e valores mais próximos de 100% são

os ideais, pois valores como este indicam que as células sobrevivem quando expostas às substâncias ou amostras utilizadas nos testes, no caso sendo a indometacina e o óleo de jacaré.

O MTT é um teste onde as células formam o formazan convertendo o MTT, passando da cor amarelada do MTT para o roxo do formazan, podendo então ser medido num espectrofotômetro. Como a conversão depende da ação das células, é seguro afirmar que a quantidade de formazan medida é proporcional a quantidade de células viáveis presentes. A morte celular impede esta conversão, logo a baixa formação de cor já é um indicativo inicial de toxicidade. O mecanismo de conversão não foi totalmente elucidado, mas alguns acreditam que o NADH está envolvido de alguma forma. Os cristais de formazan devem ser então solubilizados antes que sejam feitas as leituras. Isso pode ser feito com o uso de algumas substâncias, como DMSO, isopropanol acidificado e combinações de detergentes e solventes orgânicos. O sinal gerado depende então de fatores como a concentração do MTT, o período de incubação, e a concentração de células viáveis utilizadas no teste. Um ponto importante se dá pelo fato de altas concentrações de MTT serem apontadas como tóxicas para as células, pois os cristais de formazan oriundos da metabolização do MTT podem causar rupturas na estrutura das células (MOSMANN, 1983; DENIZOT & LANG, 1986; LÜ et. al., 2012).

No que diz respeito ao potencial anti-inflamatório do óleo, os resultados obtidos foram organizados nos gráficos abaixo (Gráfico 6).

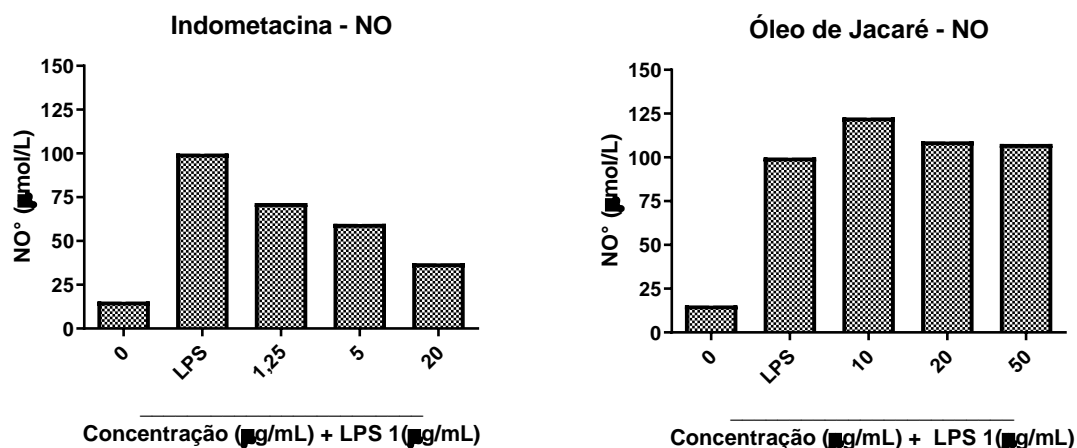


Gráfico 6- Concentrações de NO quantificados após leitura em espectrofotômetro, com presença de indometacina em diferentes concentrações, e óleo de jacaré, em diferentes concentrações. Quanto menores os índices de NO, maior ação antioxidante uma substância tem.

Os valores apontam que o óleo de jacaré não apresenta ação anti-inflamatória, visto que, diferente da indometacina, o óleo não foi capaz de reduzir os níveis de NO produzidos, mesmo nas concentrações mais altas. Porém, este resultado indica apenas que o óleo de jacaré não age sobre o NO durante o processo de inflamação, mas sabe-se que a inflamação ocorre pela ação de vários mecanismos, não dependendo apenas de um para ocorrer.

O óxido nítrico é uma molécula envolvida em diferentes condições fisiológicas e patológicas no organismo, agindo no fluxo sanguíneo, atividades neurais e resposta imune. Ele não só é produto de ação enzimática como também é gerado em tecidos por redução de nitrito a NO em condições de acidez oriundas de estados onde o organismo se apresenta como doente. A ligação entre NO e tirosina, formando nitroirosina, é considerado um indicador de inflamações *in situ*, sendo associado a patologias como aterosclerose e doenças genéticas (WOLIN, 2014; PREDONZANI et. al., 2015).

Desta forma, o NO é reconhecido como essencial nos processos de inflamação e na resposta imune. Quando ocorrem infecções, o NO apresenta atividades citotóxicas e/ou citoprotetoras, como um pró-inflamatório, ou mesmo como anti-inflamatório, sendo produzido por macrófagos e conferindo a eles atividade citotóxica ou citoestática contra patógenos e até mesmo células tumorais. Assim, o NO age como regulador na atividade de células do sistema imune, regulando propriedades dos macrófagos, mas também de mastócitos, células NK e células dendríticas (MACMICKING et. al., 1997; SHU et. al., 2014).

Mas, não é apenas o NO o responsável pela reação inflamatória. Um dos caminhos essenciais para a resposta inflamatória é a via da fosfolipase A2 (PLA2) / ácido araquidônico (AA). Na inflamação, a PLA2 é ativada, liberando ácido araquidônico, que é metabolizado pelas ciclooxigenases (COXs) e pela 5-lipooxigenase (LOX). A via das COXs, que catalisam o AA, dá origem a prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI₂) e troboxanos (TXBs), todos potentes mediadores inflamatórios e responsáveis por sintomas característicos da inflamação. As duas

isoformas de COXs, a COX-1 constitutiva e COX-2 indutível, respondem a estímulos inflamatórios de forma diferente. Entre os COXs, a COX-2 é mais ativa em casos de inflamação, se encontrando em maior quantidade. A via da 5-LOX catalisando o AA dá origem a leucotrienos (LTs), também envolvidos no processo inflamatório. A importância da via PLA2/AA em doenças inflamatórias indica que inibição desta via levaria a possíveis atividades anti-inflamatórias (BISHAYEE & KHUDA-BUKHSI, 2013; MAGRIOTI & KOKOTOS, 2013; XIE et. al., 2015).

Pesquisas com gorduras e óleos animais muitas vezes apontam para a inibição de inflamação principalmente pela via do AA. Ferreira et al., 2010, realizou testes com óleo de teiú (*Tupinambis meriana*) e os resultados apontaram para a atividade do óleo sobre a via de AA e seus metabólitos. Outra pesquisa, realizada por Schmeda-Hirschmann et. al., 2014, analisou atividade anti-inflamatória de óleos de 6 animais diferentes, um deles sendo o *Melanosuchus niger*, e foi constatada ação anti-inflamatória deste óleo frente a AA e ação ainda maior frente a TPA. Óleos inibidores de AA são geralmente inibidores de COX-1 e 5-LOX, e os inibidores de TPA agem sobre a COX-2 e óxido nítrico sintases (NOS).

Levando em consideração os resultados obtidos neste trabalho, constatamos que o óleo de jacaré não apresentou ação contra NO, e com o resultado da pesquisa acima mencionada, é possível afirmar que o óleo de *M. niger* possa agir de maior forma sobre a COX-2, mas não necessariamente apenas sobre ela. Agindo sobre a COX-2, o óleo está agindo frente a forma mais ativa das COX quando ocorrem inflamações, o que explicaria sua ação anti-inflamatória constatada em outras pesquisas.

6. CONCLUSÃO

Observamos que o óleo do jacaré-açu (*Melanosuchus niger*) apresentou altos índices de acidez e peróxidos no início dos testes, apontando para degradação ainda no transporte deste. Analisando os resultados de perfil lipídico, foram observados 16 TAGs diferentes, de uma combinação de ácido linoleico, linolênico, oleico, palmítico e esteárico, com altas concentrações dos dois últimos. Em relação aos testes, ele não apresentou atividade nos testes realizados. Mesmo assim, a ausência de atividade deste frente a amostra de *Staphylococcus aureus* pode talvez ser atribuída ao fato de a cepa utilizada possuir resistências a alguns antibióticos, o que pode ter influenciado no resultado. Além disso, o teste de atividade anti-inflamatória foi focado apenas em uma das vias da inflamação, a dos NOs, e já existem trabalhos que afirmam que o óleo desta espécie possui efeito anti-inflamatório. Mas, ao unir os dados da presente pesquisa com dados destes outros trabalhos, pressupõe-se que o óleo de jacaré possa agir frente a COX-2, interferindo em sua ação, e assim causando o efeito anti-inflamatório.

Este fato pode então ser utilizado para melhor elucidação da ação não apenas do óleo de jacaré, mas da ação de óleos de outros animais que possam apresentar comportamento parecido frente a inflamações. Mais estudos são necessários no que diz respeito a ação anti-inflamatória deste, com testes realizados *in vivo*, para que o mecanismo de ação seja devidamente elucidado e, após estes estudos, em caso de resultado positivo, novas alternativas sejam criadas para o tratamento de inflamações.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, S. A; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. **A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay.** Journal of Immunological Methods, Vol. 1759(703), p. 211-24, 1994.
- AKOH, C.C; MIN, D.B. **Food lipids. Chemistry, Nutrition and Biotechnology.** 2.ed., 2002.
- ALEXANDRI, E.; AHMED, R.; SIDDIQUI, H.; CHOUDHARY, M.I.; TSIAFOULIS, C.G.; GEROTHANASSIS, I.P. **High Resolution NMR Spectroscopy as a Structural and Analytical Tool for Unsaturated Lipids in Solution.** Molecules, Vol. 22(10), p. 1663, 2017.
- ALMARIO, R.U; VONGHAVARAVAT, V; WONG, R; KASIM-KARAKAS, S.E. **Effects of walnut consumption on plasma fatty acids and lipoprotein in combined hyperlipidemia.** Am J Clin Nutr., Vol. 74(1), p.72-79, 2001.
- ANDLAUER, W.; FÜRST, P. **Nutraceuticals: a piece of history, presente status and outlook.** Food Research International., Vol. 35, p.171-176, 2002.
- ANEED, A.E.; COHEN, A.; BANOUB, J. **Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers.** Applied Spectroscopy Reviews, Vol. 44(3), p. 210-230, 2009.
- AOAC. **International Association of Official Analytical Chemists International. Official Methods of Analysis of AOAC International.** 20 th ed., 2016.
- ASSHEUER, J.; SAGER, M. **MRI and CT atlas of the dog.** Oxford: Blackwell Science, p. 482, 1997.
- AZEVEDO, I.C. de; CARMO, R.P. do; TORRES, A.G.; MÁRSICO, E.T.; FREITAS, M.Q. de. **Teste de aceitação e composição centesimal de carne de jacaré-do-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em conserva.** Ciência Rural, Vol. 39(2), 2009.
- BARISON, A.; SILVA, C.W.P.; CAMPOS, F.R.; SIMONELLI, F.; LENZ, C.A.; FERREIRA, A.G. **A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through 1H NMR spectroscopy.** Magn. Reson. Chem., Vol. 48, p. 642–650, 2010.
- BARRETO, H.C.S.; MELO FILHO, A.A.; SOUZA, F.B.; SANTOS, R.C. **Caracterização físico-química do óleo do peixe colossoma macropomum (tambaqui) de Boa Vista-RR.** 47º CBQ- Congresso Brasileiro de Química, Natal, RN, 2007.
- BELLAVER, C.; ZANOTTO, D.L. **Parâmetros de qualidade em gorduras e subprodutos protéicos de origem animal.** Conferencia APINCO, Santos, SP, 2004. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/parametros_qualidade_gorduras_e_subprodutos_proteicos_de_origem_animal_000fyrf0t6n02wx5ok0pvo4k33hlhtkv.pdf>. Acesso em: 12 de julho de 2019.

BISHAYEE, K.; KHUDA-BUKHSH, A.R. **5-lipoxygenase antagonista therapy: a new approach towards targeted cancer chemotherapy**. Acta Biochimica Biophysica Sinica (Shanghai), Vol. 45, p. 709–719, 2013.

BONA, E.A.M de; PINTO, F.G.S; FRUET, T.K; JORGE, T.C.M; MOURA, A.C. de. **Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, Vol. 81(3), p.218-225, 2014. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572014000300218&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 20 de maio de 2018.

BOTHAM, K.M.; MAYES, P.A. **Lípidos de Importância Fisiológica**. Harper Bioquímica Ilustrada. 29 ed. McGraw-HILL Interamericana Editores, S.A., p. 140 -151, 2012.

BRASIL *b*. Instrução Normativa nº 28, de 26 de julho de 2018. “**Estabelece as listas de constituents, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares**.” Órgão emissor – ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/417403/IN+n+28%2C+de+2018/df781ca5-1024-4836-ab1e-8cd56fbd4789>>. Acesso em: 04 de abril de 2019.

BRASIL. Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999. Aprova o “**Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos**”. Órgão emissor – ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/1999/prt0398_30_04_1999.html>. Acesso em: 22 de maio de 2019.

BRASIL. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Aprova o “**Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal**”. Órgão emissor – ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0270_22_09_2005.html>. Acesso em: 12 de maio de 2019.

BRASIL *a*. Resolução RDC nº 243, de 26 de julho de 2018. “**Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares**.” Órgão emissor – ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.imprensa.nacional.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379969/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-243-de-26-de-julho-de-2018-34379917>. Acesso em: 04 de abril de 2019.

BUTHELEZI, S.; SOUTHWAY, C.; GOVINDEN, U.; BODENSTEIN, J.; DU TOIT, K. **An investigation of the antimicrobial and anti-inflammatory activities of crocodile oil**. J Ethnopharmacol. Vol. 143, p. 325–330, 2012.

CAJKA, T.; FIEHN, O. **Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry**. Trends Anal. Chem., Vol. 61, p. 192–206, 2014.

CALDER, P.C. **Polyunsaturated fatty acids and inflammation**. Biochemical Society Transactions, Vol. 33, p. 423–427, 2005.

CARDOSO, C.R.; FAVORETO, S.; OLIVEIRA, L.L.; VANCIM, J.O.; BARBAN, G.B.; FERRAZ, D.B., SILVA, J.S. **Oleic acid modulation of the immune response in wound healing: A new approach for skin repair**. Immunobiology, Vol. 216, p. 409–415, 2011.

CARMO, M.C.N.S; CORREIA, M.I.T.D.A. **Importância dos ácidos graxos ômega-3 no câncer**. Rev Br Canc., Vol. 55(3), p.279-287, 2009.

CASTELLINI, A.; CANAVARI, M. & PIRAZZOLI, C. **Functional foods in the European Union: an overview of the sector's main issues**. VIII Conference on food, agriculture and environment, Red Cedar Lake, Wisconsin, 2002.

CASTRO, H.F. de; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C. dos; AGUIAR, C.L. de. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação**. Quím. Nova, São Paulo, Vol. 27(1), p. 146-156, 2004.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard-Tenth Edition**. Wayne, CLSI document M02-A10, 2009.

COSTA, C.K.; SILVA, C.B.; LORDELLO, A.L.L.; ZANIN, S.M.W.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. **Identificação de δ tocotrienol e de ácidos graxos no óleo fixo de urucum (*Bixa orellana* Linné)**. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, Vol.15(4), p.508-512, 2013.

COUTINHO, M.; CANTO, S.; MENDONÇA, S.; MALVASIO, A.; VON MÜHLEN, E.; ANDRADE, T.; LIMA, F.; VIEIRA, T.; MARIONI, B.; FONSECA, C.; TEIXEIRA, F.; SOARES, E.; SALERA, G.JR.; GARCIA, M.; KLUCZKOVSKI, A.; RUFFEIL, L.; SAMPAIO, P. **Distribution and abundance of black caimans (*Melanosuchus niger*) in the Brazilian Amazon**. In: 18th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group, IUCN., p. 222, 2006.

CREXI, V.T.; SOUZA-SOARES, L.A.; PINTO, L.A.A. **Carp (*Cyprinus carpio*) oils obtained by fish meal and ensilage processes: characteristics and lipid profiles**. International Journal of Food Science and Technology, Vol. 44, p. 1642–1648, 2009.

DENIZOT, F.; LANG, R. **Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability**. J. Immunol. Meth., Vol. 89, p. 271–277, 1986.

DIAS, P.C.M; ALVES, J.M. **Avaliação da estabilidade oxidativa de cápsulas de concentrado de óleo de peixe**. Revista Eletrônica Estácio Saúde, Vol. 2(1), 2013. Disponível em: <<http://revistaadmmade.estacio.br/index.php/saudesantacatarina/article/view/502/328>>. Acesso em: 12 de julho de 2019.

DZOYEM, J.P.; ELOFF, J.N. **Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidant activity of leaf extracts of twelve plants used traditionally to alleviate pain and inflammation in South Africa**. Journal of Ethnopharmacology, Vol. 160, p. 194–201, 2015.

ESPÍN, J.C.; GARCÍA-CONESA, M. T.; BARBERÁN, F.A.T. **Nutraceuticals: Facts and fiction**. Phytochemistry., Vol. 68, p. 2986-3008, 2007.

FAHY, E.; SUBRAMANIAM, S.; BROWN, H.A.; GLASS, C.K.; MERRILL, A.H.; MURPHY, R.C.; RAETZ, C.R.H.; RUSSELL, D.W.; SEYAMA, Y.; SHAW, W.; SHIMIZU, T.; SPENER, F.; VAN MEER, G.; VANNIEUWENHZE, M.S.; WHITE, S.H.; WITZTUM, J.L.; DENNIS, E.A. **A comprehensive classification system for lipids.** J. Lipid Res., Vol. 46(5), p. 839-862, 2005.

FALODUN, A.; OWOLABI, O.J.; OSAHON, O. **Physicochemical, antimicrobial and anti-inflammatory evaluation of fixed oil from *Boa constrictor*.** Acta Poloniae Pharmaceutica: Drug Research, Vol. 65(4), p. 477-480, 2008.

FANALI, C.; DUGO, L.; CACCIOLA, F.; BECCARIA, M.; GRASSO, S.; DACHÀ, M.; DUGO, P.; MONDELLO, L. **Chemical Characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) Oil.** J. Agric. Food Chem., Vol. 59, p. 13043-13049, 2011.

FERREIRA, F.; BRITO, V.; SARAIVA, R.; ARARUNA, M.; MENEZES, I.; COSTA, J.; COUTINHO, H.; ALMEIDA, W.; ALVES, R. **Topical anti-inflammatory activity of body fat from the lizard *Tupinambis merianae*.** Journal of Ethnopharmacology, Vol. 130, p. 514-520, 2010.

FERRARI, R.A.; SCHULTE, E.; ESTEVES, W.; BRÜHL, L.; MUKHERJEE, K.D. **Minor constituents of vegetable oils during industrial processing.** J. Am. Oil Chem. Soc., Vol. 73, p. 587-592, 1996.

FILHO, A.A.M.; OLIVEIRA, H.H. de; SANTOS, R.C. dos. **Omega-6/Omega-3 and PUFA/SFA in *Colossoma macropomum* Grown in Roraima, Brazil.** Orbital Elec. J. Chem., Vol. 5(1), p. 30-34, 2013.

FRIES, R., MITSUHASHI, M. **Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of alamar Blue™ assay to 3 H-thymidine incorporation assay.** J. Clin. Lab. Anal., Vol. 9, p. 89, 1995.

GAROFOLO, A.; PETRILLI, A.S. **Balço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia.** Rev. Nutr., Campinas, Vol. 19(5), p. 611-621, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732006000500009&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 01 de junho de 2019.

GOMES, G. Q.; PALHA, M. das D. C.; ARAUJO, J. da C.; SILVA, A. do S. L. da. **Morfometria e endocrinologia de jacaré-tinga (*Caiman crocodilus*) em cativeiro.** In: Anais do XII SEMINÁRIO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRA, Belém, PA, 2014.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. **Analysis of nitrate, nitrite, and [N15 nitrates] in biological fluids.** Analytical Biochemistry, Vol. 26, p. 131-138, 1982.

GULATI, O.P.; OTTAWAY, P.B. **Legislation relating to nutraceuticals in the European Union with a particular focus on botanical-sourced products.** Toxicol., Vol.221, p. 75-87, 2006.

HAGE, M.C.F.N.S.; IWASAKI, M. **Imagem por ressonância magnética: princípios básicos.** Ciência Rural, Santa Maria, Vol.39(4), p. 1287-1295, 2009.

HENRY, G.E., MOMIN, R.A., NAIR, M.G., DEWITT, D.L. **Antioxidant and cyclooxygenase activities of fatty acids found in food.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 50, p. 2231–2234, 2002.

HUNTER, J. E. **Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides.** Lipids, Vol. 36, p. 655–668, 2001.

IGLESIAS, N. N.; PANCORBO, A. C.; RODRIGUEZ, L. C. **From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century.** Part II: analytical lipidomics, Trends Anal. Chem., Vol. 28, p. 393–403, 2009.

INHAMUNS, A.J.; FRANCO, M.R.B. **Composition of total, neutral and phospholipids in mamará (*Hypophthalmus* sp.) from the Brazilian Amazonian area.** J. Agric. Food Chem., Vol. 49, p. 4859–4863, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos** /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JIANG, Q. **Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant and anti-inflammatory activities and the role in disease prevention and therapy.** Free Radic Biol Med., Vol. 72, p. 76–90, 2014.

KARAKAYA, S. **Bioavailability of phenolic compounds.** Crit. Ver. Food. Sci. Nutr., Vol. 44(6), p. 453-464, 2004.

KASSUYA, C.A.L.; PIUBELLI, M. **Aspectos Gerais da Inflamação e da Dor**, 2013.

KESTON, A. S.; BRANDT, R. **The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide.** Anal. Biochem., Vol. 11, p. 1–5, 1965.

KIM, D. O.; LEE, C. Y. **Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship.** Rev. Food Sci. Nutr., Vol. 44(4), p. 253–273, 2004.

KLUCZKOVSKI JUNIOR, A.; De FRANCISCO, A.; BEIRÃO, L.; KLUCZKOVSKI, A.; BARBOSA, H. **Lipids of Amazon Caimans: A source of fatty acids.** Afr. J. Biotechnol., Vol. 15(29), p. 1559-1565, 2016.

KLUCZKOVSKI JUNIOR, A. **Caracterização do perfil de ácidos graxos da gordura e no concentrado proteico e caracterização da textura da carne de jacarés.** Dissertação (Doutorado em Ciências dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis, 2017. Disponível em: <
<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/194003/PCAL0441-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 08 de julho de 2019.

KRÄMER, K.; HOPPE, P.; PACKER, L. **Nutraceuticals in Health and Disease Prevention.** Nova Iorque: CRC Press, 2001.

KRUGER, C.L.; MANN, S.W. **Safety evaluation of functional ingredients.** Food and Chemical Toxicology., Vol. 41, p. 793-805, 2003.

KYNGMI, M.S.; EBELER, E. **Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels.** Food Chem Toxicol., Vol. 46, p. 96-104, 2008.

LAI, L.; MICHPOULOS, F.; GIKA, H.; THEODORIDIS, G.; WILKINSON, R.W.; RAJESH ODEDRA, R.; WINGATE, J.; BONNER, R.; TATE, S.; WILSON, I.D. **Methodological considerations in the development of HPLC-MS methods for the analysis of rodent plasma for metabonomic studies.** Molecular Biosystems, Vol. 6(1), p. 108-120, 2009.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. **Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation.** Nat. Rev. Immunol, Vol. 2(10), p. 787-95, 2002.

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA, E.L. **Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Candida.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, Vol. 16(2), p. 197-201, 2006.

LIMA, M.F. **Ácido Graxo ômega 3 docosahexaenoico (DHA C22:6 n-3) desenvolvimento neonatal: aspectos relacionados a sua essencialidade e suplementação.** Nutrire: Rev Soc Br Alim Nutr., Vol. 68, p. 65-77, 2004.

LIRA, C.R.G.; ZUCCO, F; NEGRÃO, A.N.; SILVA, M.A.S.; MURAKAMI, F.S. **Nutracêuticos: Aspectos sobre Segurança, Controle de Qualidade e Legislação.** Revista Brasileira de Farmácia, Rio de Janeiro, Vol. 90(1), p. 45-49, 2009.

LÍSA, M.; HOLCAPEK, M. **Triacylglycerols profiling in plant oils important in food industry, dietetics and cosmetics using high-performance liquid chromatography - atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry.** J. Chromatogr., Vol. 1198-1199, p. 115-130., 2008.

LÖVKVIST, S. **An investigation of the lipid content and lipid composition in Atlantic salmon, pink salmon and striped catfish, obtained at the local retailer in Uppsala, Sweden.** Swedish University of Agricultural Sciences., Second cycle, A1E. Uppsala: SLU, Dept. of Food Science Uppsala, 2014.

LÜ, L.; ZHANG, L.; WAI, M.S.; YEW, D.T.; XU, J. **Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury.** Toxicol In Vitro, Vol. 26(4), p. 636-44, 2012.

MAALOUF, S.; EL-SABBAN, M.; DARWICHE, N.; GALI-MUHTASIB, H. **Protective effect of vitamin E on ultraviolet B light-induced damage in keratinocytes.** Mol Carcinog., Vol. 34, p. 121-130, 2002.

MACMICKING, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. **Nitric oxide and macrophage function.** Annu. Rev. Immunol., Vol. 15, p. 323-350, 1997.

MAGRIOTI, V.; KOKOTOS, G. **Phospholipase A2 inhibitors for the treatment of inflammatory diseases: a patent review.** Expert Opinion on Therapeutic Patents, Vol. 23, p. 333-344, 2013.

MARIONI, B.; FARIAS, I.; VERDADE, L.M.; BASSETTI, L.; COUTINHO, M.E.; MENDONÇA, S.H.S.T.; VIEIRA, T.Q.; MAGNUSSON, W.E.; CAMPOS, Z. **Avaliação do risco de extinção do jacaré-açu *Melanosuchus niger* (Spix, 1825) no Brasil**. Biodiversidade Brasileira, Vol. 3(1), p. 31-39, 2013.

MARTIN, C.A; ALMEIDA, V.V. DE; RUIZ, M.R; VISENTAINER, J.E.L; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E. DE; VISENTAINER, J.V. **Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos**. Revista de Nutrição, Vol. 19(6), p. 761-770, 2006.

MARTÍNEZ-YUSTA, A.; GOICOECHEA, E.; GUILLÉN, M.D. **A Review of Thermo-Oxidative Degradation of Food Lipids Studied by ¹H NMR Spectroscopy: Influence of Degradative Conditions and Food Lipid Nature**. Comp. Ver. in Food Sci. and Food Saf., Vol. 13, p. 838-859, 2014.

MARTINS, M.G.; MARTINS, D.E.G.; PENA, R.S. **Chemical composition of different muscle zones in pirarucu (*Arapaima gigas*)**. Food Sci. Technol, Campinas, Vol. 37(4), p. 651-656, 2017.

MELLO, V.M.; SUAREZ, P.A.Z. **As formulações de tintas expressivas através da história**. Revista Virtual de Química, Vol. 4(1), p. 2-12, 2012.

MORAES, F.P; COLLA, L.M. **Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde**. Revista Eletrônica de Farmácia, Vol. 3(2), p. 109-122, 2006.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays**. Journal of Immunological Methods, Vol. 65(1-2), p. 55-63, 1983.

NAKAYAMA, G.R.; CATON, M.C.; NOVA, M.P.; PARANDOOSH, Z. **Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro**. Journal of Immunological Methods, Vol. 204(2), p. 205-208, 1997.

OLIVEIRA, O.P. **Avaliação da composição química e atividade antimicrobiana e anti-inflamatória do óleo extraído da gordura corporal de *Spilotes pullatus* (Linnaeus, 1758) (Colubridae: Ophidia) da Chapada do Araripe no Nordeste brasileiro**. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção celular). Universidade Regional do Cariri, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Crato, CE, 2013. Disponível em: <<http://mbm.urca.br/pdf/dissertacoes/Olga%20Paiva%20Oliveira.pdf>>. Acesso em: 15 de julho de 2019.

OSTHOFF, G.; HUGO, A.; BOUWMAN, H.; BUSS, P.; GOVENDER, D.; JOUBERT, C.C.; SWARTS, J.C. **Comparison of the lipid properties of captive, healthy wild and pancreatitis-affected wild Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*)**. Comp. Biochem. Physiol., Vol. 155, p. 64-69, 2010.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. **Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe**. J. Agric. Food Chem., Vol. 49, p. 4619-4626, 2001.

PAGÉ, B.; PAGÉ, M.; NOEL, N. **A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro.** *Int. J. Oncol.*, Vol.3, p. 473, 1993.

PALTHUR, M.P.; PALTHUR, S.S.; CHITTA, S.K. **Nutraceuticals: A conceptual definition.** *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* Vol. 2, 2010.

PIOVESAN, C.H. **Efeito da Modificação do Estilo de Vida Sobre a Qualidade da Dieta em Indivíduos com Síndrome Metabólica.** Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2009. Disponível em: <<http://tede2.pucrs.br/tede2/bitstream/tede/1582/1/424193.pdf>>. Acesso em: 20 de junho de 2018.

PLUMB, R.S.; STUMPF, C.L.; GORENSTEIN, M.V.; CASTRO - PEREZ, J.M.; DEAR, G.J.; ANTHONY, M.; SWEATMAN, B.C.; CONNOR, S.C.; HASELDEN, J.N. **Metabonomics: the use of electrospray mass spectrometry coupled to reversed-phase liquid chromatography shows potential for the screening of rat urine in drug development.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Vol. 16(20), p. 1991-1996, 2002.

PLUMB, R.S.; JOHNSON, K.A.; RAINVILLE, P.; SHOCKCOR, J.P.; WILLIAMS, R.; GRANGER, J.H.; WILSON, I.D. **The detection of phenotypic differences in the metabolic plasma profile of three strains of Zucker rats at 20 weeks of age using ultra-performance liquid chromatography/orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, Vol. 20(19), p. 2800-2806, 2006.

PODSEDEK, A. **Natural antioxidants capacity of brassica vegetables: a review.** *J Food Compos Anal*, Vol. 40, p. 1-11, 2007.

PREDONZANI, A.; CALÌ, B.; AGNELLINI, A.H.R.; MOLON, B. **Spotlights on immunological effects of reactive nitrogen species: When inflammation says nitric oxide.** *World J. Exp. Med.*, Vol. 5(2), p. 64-76, 2015.

PUPA, J.M.R. **Óleos e gorduras na alimentação de aves e suínos.** *Revista Eletrônica Nutritime*, Vol. 1(1), p.69-73, 2004. Disponível em: <http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/009V1N1P69_73_JUL2004.pdf>. Acesso em: 22 de maio de 2019.

PYKETT, I.L.; NEWHOUSE, J.H.; BUONANNO, F.S.; BRADY, T.J.; GOLDMAN, M.R.; KISTLER, J.P.; POHOST, G.M. **Principles of nuclear magnetic resonance imaging.** *Radiology*, Illinois, Vol.143, p.157-168, 1982.

REBELLO, T.J.J.; FERNANDES, A.F.F.; FOLINO, C.H.; DUARTE, T.; FONTES, R.; NASCIMENTO, J.R.; ESPERANÇA, T.C.R.B.; LAGE, D. **Alimentos funcionais e nutracêuticos: uma proposta de educação nutricional a partir do ensino de bioquímica.** *e-Mosaicos*, 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/291585342_ALIMENTOS_FUNCIONAIS_E_NUTRACEUTICOS_UMA_PROPOSTA_DE_EDUCACAO_NUTRICIONAL_A_PARTIR_DO_ENSINO_DE_BIOQUIMICA>. Acesso em: 22 de abril de 2019.

RINGBOM, T.; HUSS, U.; STENHOLM, A.; PERERA, P.; BOHLIN, L. **COX-2 inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids**. *Journal of Natural Products*, Vol. 64, p. 745–749, 2001.

RÍOS, J.L.; RECIO, M.C.; ESCANDELL, J.M.; ANDÚJAR, I. **Inhibition of transcription factors by plant-derived compounds and their implications in inflammation and cancer**. *Curr. Pharm. Des.*, Vol. 15(11), p. 1212-37, 2009.

ROCK, K. L.; KONO, H. **The inflammatory response to cell death**. *Annu. Rev. Pathol.*, Vol. 3, p. 99-126, 2008.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M. **Harvestplus handbook for Carotenoid analysis**. Washington: International Food Policy Research Institute; 2004.

SACCHI, R.; SAVARESE, M.; FALCIGNO, L.; GIUDICIANNI, I.; PAOLILLO, L. **Proton NMR of Fish Oils and Lipids**. Graham A. Webb (ed.), *Modern Magnetic Resonance*, p. 919–923, 2008.

SALES, R.L.; COSTA, N.M.B.; MONTEIRO, J.B.R.; PELUZIO, M.C.G.; COELHO, S.B.; OLIVEIRA, C.G. DE; MATTES, R. **Efeitos dos óleos de amendoim, açafrão e oliva na composição corporal, metabolismo energético, perfil lipídico e ingestão alimentar de indivíduos eutróficos normolipidêmicos**. *Revista de Nutrição*, Vol. 18(4), p. 499-511, 2005.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; DELPORTE, C.; VALENZUELA-BARRA, G.; SILVA, X.; VARGAS-ARANA, G.; LIMA, B.; FERESINE, G.E. **Anti-inflammatory activity of animal oils from the Peruvian Amazon**. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 156, p. 9-15, 2014.

SERFERT, Y.; DRUSCH, S.; SCHWARZ, K. **Sensory odour profiling and lipid oxidation status of fish oil and microencapsulated fish oil**. *Food Chemistry*, Vol. 123(4), p. 968-975, 2010.

SHEPHERD, C.J.; JACKSON, A.J. **Global fishmeal and fish oil supply: inputs, outputs and markets**. *J Fish Biol.*, Vol. 83(4), p. 1046–1066, 2013.

SHU, L.; VIVEKANANDAN-GIRI, A.; PENNATHUR, S.; SMID, B.E.; AERTS, J.M.; HOLLAK, C.E.; SHAYMAN, J.A. **Establishing 3-nitrotyrosine as a biomarker for the vasculopathy of Fabry disease**. *Kidney Int*, Vol. 86, p. 58-66, 2014

SIMOPOULOS, A.P. **The importance of the omega-6/omega-3 Fatty Acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases**. *Exp. Biol. Med.*, Vol. 233, p. 674–688, 2008.

SIMOPOULOS, A.P. **The importance of the omega-6/omega-3 Balance in Health and Disease: Evolutionary Aspects of Diet**. In *Healthy Agriculture, Healthy Nutrition, Healthy People*; Ed.; Karger: Basel, Switzerland, Vol. 102, p. 10–21, 2011.

SIMOPOULOS, A.P. **An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity**. *Nutrients.*, Vol. 8(3), p. 128, 2016.

SILVA, A.C.N.; VASCONCELOS JÚNIOR, A.A.; CUNHA, F.A.; CUNHA, M.C.S.O.; MENEZES, E.A. **Teste de sensibilidade de *Candida albicans* pelo método de disco-difusão: uma comparação de meios de cultura**. Rev. Bras. de Análises Clínicas, Vol. 48(4), p. 363-369, 2016.

SILVA, L.P.; JOANITTI, G.A.; LEITE, R.S.; AZEVEDO, R.B. **Comparative study of the antimicrobial activities and mammalian cytotoxicity of 10 fatty acid-rich oils and fats from animal and vegetable**. The Natural Products Journal, Vol. 1(1), p. 40-46, 2011.

SILVEIRA, G.D. **Estudo da atividade antioxidante in vitro e caracterização cromatográfica em extratos de plantas medicinais da amazônia**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/10566/SILVEIRA%2C%20GESSICA%20DOMINGOS%20DA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 18 de julho de 2019.

SMITH, H.; RANALLO, F.N. **A non-mathematical approach to basic MRI**. Wisconsin: Medical Physics, 203p., 1989.

SOARES, L.A.; TAKEUTI, T.D.; VALERI, P.A.O.; SILVA, A.A.; LARA, B.H.J.; TERRA-JÚNIOR, J.A.; FREITAS, O.; CREMA, E. **Impactos nutricionais da ingestão alimentar dos ácidos graxos ômega 3 e óleo de palma: uma revisão**. Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento, São Paulo. Vol. 10(56), p. 105-114, 2016.

SOARES, S. E. **Ácidos fenólicos como antioxidantes**. Revista de Nutrição, Vol. 15(1), p. 71-81, 2002.

SOUYOUL, S. A.; SAUSSY, K. P.; LUPO, M. P. **Nutraceuticals: A Review**. Dermatology and Therapy, Vol. 8(1), p. 5–16, 2018.

SOUZA, B.C.S.; SANTOS, G.A. dos; CAMPOS, R.M.L de. **Carne de jacaré – revisão de literatura**. Revista eletrônica nutritime. Artigo 277, Vol. 11(6), p. 3741– 3754, 2014.

SOUZA, F. B.; MELO FILHO, A. A.; BARRETO, H. C. S. **Caracterização físico-química do óleo do peixe *Leporinus friderici* (aracú-cabeça-gorda) de Boa Vista-RR**. 47º CBQ- Congresso Brasileiro de Química, Natal, RN, 2007.

SULOMA, A.; OGATA, H.Y.; GARIBAY, E.S.; CHAVEZ, D.R.; EL-HAROUN, E.R. **Fatty acid composition of nile tilapia *oreochromis niloticus* muscles: a comparative study with commercially important tropical freshwater fish in philippines**. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture, 2008.

SUAREZ, P.A.Z.; MENEGHETTI, S.M.P.; MENEGHETTI, M.R.; WOLF, C.R. **Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica**. Química Nova, Vol. 30(3), p. 667-676, 2007.

SUCUPIRA, N.R.; SILVA, A.B.; PEREIRA, G.; COSTA, J.N. **Métodos para a determinação da atividade antioxidante de frutos**. Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde, Vol. 14, p. 263-269, 2012.

THORBJARNARSON, J. *Melanosuchus niger*. Crocodile Specialist Group Action Plan, IUCN, 2010. Disponível em: <http://www.iucnscg.org/365_docs/attachments/protarea/06_M-24b37cab.pdf>. Acesso em: 22 de junho de 2019.

TOLSTIKOV, V. V.; LOMMEN, A.; NAKANISHI, K.; TANAKA, N.; FIEHN, O. **Monolithic silica-based capillary reversed-phase liquid chromatography/electrospray mass spectrometry for plant metabolomics**. Analytical Chemistry, Vol. 75, p. 6737–6740, 2003.

TROWBRIDGE, H. O.; EMLING, R. C. **Inflammation: a review of the process**. Chicago: Quintessence Pub. Co., 5th. ed., 1997.

VAZ, D.S.S.; GUERRA, F.M.R.M.; GOMES, C.F.; SIMÃO, A.N.C; JUNIOR, J.M. **a importância do ômega 3 para a saúde humana: um estudo de revisão**. Revista Uningá Review, Vol. 20(2), p. 48-54, 2014.

VILLAFANA, T. **Fundamental physics of magnetic resonance imaging**. Radiologic Clinics of North America, Philadelphia, Vol. 26(4), p.701-715, 1988.

VITOR, J.I.E.; SILVA, P.P. da; COSTTA, J.F. da; CREXI, V.T.; PINTO, L.A.A. **Obtenção de óleo de peixe a partir de resíduos do beneficiamento da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Em: Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Campinas: GALOÁ, 2016. Disponível em: <<https://proceedings.science/cobeq/cobeq-2016/papers/obtencao-de-oleo-de-peixe-a-partir-de-residuos-do-beneficiamento-da-tilapia-do-nilo-%28oreochromis-niloticus%29?lang=pt-br>>. Acesso em: 29 de agosto de 2018.

WALKER, G. S.; RYDER, T. F.; SHARMA, R.; SMITH, E. B.; FREUND, A. **Validation of isolated metabolites from drug metabolism studies as analytical standards by quantitative NMR**. Drug Metabolism and Disposition, Vol. 39(3), p. 433-440, 2011.

WEBER, P.; BENDICH, A.; SCHALCH, W. **Vitamin C and human health: a review of recent data relevant to human requirements**. Int Z Vitam, Vol. 6, p. 19-30, 1996.

WEE, L. M.; LONG, L. H.; WHITEMAN, M.; HALLIWELL, B. **Factors affecting the ascorbate-and phenolic-dependent generation of hydrogen peroxide in Dulbecco's Modified Eagles Medium**. Free radical research, Vol. 37(10), p. 1123-1130, 2003.

WOLFE K. L.; LIU R. H. **Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods and Dietary Supplements**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Department of Food Science and institute of Comparative and Environmental Toxicology, Cornell University, Ithaca, New York, Vol. 55, p. 8896-8907, 2007.

WOLIN, M.S. **Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Vascular Function, in Studies on Pediatric Disorders**. In: Tsukahara, H.; Kaneko, K. editors, New York: Springer, p. 15-33, 2014.

WU, X.; CHENG, J.; WANG, X. **Dietary antioxidants: potential anticancer agents**. Nutr Cancer, Vol. 69, p. 521–533, 2017.

XIE, C.; LI, X.; WU, J.; LIANG, Z.; DENG, F.; XIE, W.; ZHU, M.; ZHU, J.; ZHU, W.; GENG, S.; ZHONG, C. **Anti-inflammatory Activity of Magnesium Isoglycyrrhizinate Through Inhibition of Phospholipase A2/Arachidonic Acid Pathway**. *Inflammation.*, Vol. 38(4), p. 1639-48, 2015. Disponível em: <
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10753-015-0140-2>>. Acesso em: 20 de julho de 2019.

YOGANATHAN, S.; NICOLOSI, R.; WILSON, T.; HANDELMAN, G.; SCOLLIN, P.; TAO, R.; BINFORD, P.; ORTHOEFER, F. **Antagonism of croton oil inflammation by topical emu oil in CD-1 mice**. *Lipids*, Vol 38, p. 603–607, 2003.

ZHAO, G.; ETHERTON, T.D.; MARTIN, K.R.; VANDEN HEUVEL, J.; GILLIES, P.; WEST, S.; KRIS – ETHERTO, P. **Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP- 1 cells**. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 336, p. 909–917, 2005.

ZHENG, C. J.; YOO, J. S.; LEE, T. G.; CHO, H. Y.; KIM, Y. H.; KIM, W. G. **Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids**. *FEBS Letters*, Vol. 579, p. 5157–5162, 2005.