



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

SHEILA CRISTINA DE OLIVEIRA ALVES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTES,
HIPOCOLESTEROLÊMICO E ANTITUMORAL DA SEMENTE E
ÓLEO DE CHIA**

**CAMPINAS
2017**

SHEILA CRISTINA DE OLIVEIRA ALVES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTES, HIPOCOLESTEROLÊMICO E
ANTITUMORAL DA SEMENTE E ÓLEO DE CHIA**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Doutora em
Ciência de Alimentos.

Supervisor/Orientador: Prof^o. Dr. Marcelo Alexandre Prado

Co-supervisora/Coorientadora: Dr^a. Débora Barbosa Vendramini Costa

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
SHEILA CRISTINA DE OLIVEIRA ALVES, E
ORIENTADA PELO PROF^o. DR. MARCELO
ALEXANDRE PRADO.**

**CAMPINAS
2017**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 2013/118420-5

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

OL4a Oliveira Alves, Sheila Cristina de, 1977-
Avaliação dos efeitos antioxidantes, hipocolesterolêmico e antitumoral da semente e óleo de chia / Sheila Cristina de Oliveira Alves. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Marcelo Alexandre Prado.
Coorientador: Débora Barbosa Vendramini Costa.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Chia. 2. Compostos fenólicos. 3. Ácidos graxos. 4. Colesterol. 5. Cancer. I. Prado, Marcelo Alexandre. II. Costa, Débora Barbosa Vendramini. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of antioxidant, hypocholesterolemic and antitumoral effects of the chia seed and oil

Palavras-chave em inglês:

Chia

Phenolic compounds

Fatty acids

Cholesterol

Cancer

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Marcelo Alexandre Prado [Orientador]

Ana Augusta Odorissi Xavier

Cíntia Baú Betim Cazarin

Luciana Azevedo

Severino Matias de Alencar

Data de defesa: 28-07-2017

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Marcelo Alexandre Prado
Presidente
Departamento de Ciência de Alimentos – FEA – UNICAMP

Dr^a. Ana Augusta Odorissi Xavier
Membro Titular
Departamento de Ciência de Alimentos – FEA – UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Cíntia Baú Betim Cazarin
Membro Titular
Departamento de Alimentos e Nutrição – FEA – UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Luciana Azevedo
Membro Titular
Faculdade de Nutrição – Universidade Federal de Alfenas

Prof^o. Dr. Severino Matias de Alencar
Membro Titular
ESALQ – USP

Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

"Regozijai-vos no Senhor, vós justos, pois aos retos fica bem o louvor.
Louvai ao Senhor com harpa, cantai-lhe louvores com saltério de dez cordas.
Cantai-lhe um cântico novo; tocai bem e com júbilo.
Porque a palavra do Senhor é reta; e todas as suas obras são feitas com fidelidade.
Ele ama a retidão e a justiça; a terra está cheia da benignidade do Senhor.
Pela palavra do Senhor foram feitos os céus, e todo o exército deles pelo sopro da sua boca.
Ele ajunta as águas do mar como num montão; põe em tesouros os abismos.
Tema ao Senhor a terra toda; temam-No todos os moradores do mundo.
Pois Ele falou, e tudo se fez; Ele mandou, e logo tudo apareceu.
O Senhor desfaz o conselho das nações, anula os intentos dos povos. O conselho do Senhor
permanece para sempre, e os intentos do seu coração por todas as gerações.
Bem-aventurada é a nação cujo Deus é o Senhor, o povo que Ele escolheu para sua herança."
Salmos 33:1-12

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito,
nos aproxima."

Louis Pasteur

**A Ciência de Deus é Imutável e Inesgotável,
não nos cansa, nem nos fadiga,
simplesmente nos conduz,
para alegria da Eternidade...**

DEDICATÓRIA

Dedico esse estudo primeiramente ao Senhor Jesus! Aquele que me formou e me chamou para fazer parte do seu Reino; pois sem Ele nada posso fazer...

Ao meu amado e precioso marido, Luiz Carlos, que sempre esteve ao meu lado me incentivando e apoiando em tudo. Te amo!

Aos meus pais, que sempre me instruíram na jornada da vida. Vocês são exemplo de trabalho e dedicação. Obrigada por todos os ensinamentos!

À minha sogra querida, Helena Lazarini (*in memoriam*), minha segunda mãe. Obrigada pelo carinho e companherismo no início desta jornada!

Aos meus irmãos, Thiago e Karine, que se alegram sempre com as minhas conquistas. A vida seria triste sem vocês!

À todos vocês dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me fortalecer nesta jornada e não permitir que eu desistisse do meu sonho. Obrigada Senhor Jesus!

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pelo privilégio de cursar a Pós-graduação em Ciência de Alimentos.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos pela oportunidade, infraestrutura e recepção.

Ao professor Marcelo Prado, pelo apoio, incentivo, confiança e por me orientar sempre.

À minha coorientadora Débora Vendramini Costa, pelo apoio e orientação em todos os momentos dos ensaios biológicos e principalmente nas correções deste estudo.

Ao meu marido, Luiz Carlos, pela compreensão em todos os momentos que precisei estar ausente para que os meus estudos fossem realizados com sucesso. Principalmente, por me encorajar e ajudar a seguir meus sonhos e projetos.

À minha família pelo apoio, amizade e amor confiados a mim em tempo integral.

À Professora Maria do Rosário Bronze que me apoiou nas pesquisas e análises na Universidade de Lisboa, Portugal. Obrigada a toda equipe do laboratório de cromatografia iMed/ULisboa, principalmente João Ferreira e Andreia Bento, por me ajudarem na execução das análises. Agradeço ao iBET e ITQB pelas análises realizadas.

Ao CPQBA – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas e à pessoa incrível do professor João Ernesto de Carvalho. Obrigada Prof. João por abrir as portas das instalações e ceder materiais para desenvolvimento desta pesquisa.

Ao time do CPQBA, divisão de Farmacologia e Toxicologia, o qual levarei em meu coração, pelas amizades e apoio: Sirlene, Karin, Ana Lúcia, Ana Possenti, Rafael, Vanessa, Lucas, Janderson, Giovanna, Larissa, Paula Paiva, Michelle e principalmente, Fabiana e Thais, que me ensinaram e auxiliaram muito neste estudo.

Agradeço especialmente aos professores e seus auxiliares: João Ernesto de Carvalho, Ana Lúcia Ruiz, Sirlene Valério Tinti, Juliana Azevedo Lima Pallone, Helena Texeira Godoy, Mário Maróstica Júnior, Cínthia Cazarin, Daniel Barrera Arellano, Renato Grimaldi, Marcella Stahl, Marcelo Cristianini, Wagner Favaro e Eduardo Socca pelos auxílios técnicos e analíticos, fatores essenciais no sucesso deste estudo.

Aos técnicos de laboratório Marcela, Miriam, Nadir, Eduardo, Rodolfo e Sr. Dirceu, muito obrigada pelas boas condições de trabalho, apoio e organização dos laboratórios. Em especial,

Miriam, Rodolfo e Sr. Dirceu que me ajudaram nas realizações das análises e pelo apoio em todos os momentos.

Aos amigos do Lab. Análise e Bioaromas: Cristiano Ballus, Danilo, Jane, Janclei, Well Cabeça, Maria Rosa, Thaís, Tayse, Lenaice, Leonardo, Gustavo, Henrique, Pollyana, Marcus, Matheus, Marla, Adriana, Stefany, Dani, Kleidson, Ana Paula, Joyce, Viviane, Alisson e Michelly Paludo, pela companhia e tolerância em todos esses anos.

Às minhas eternas amigas Alane Cangani e Michele Machado, vocês fizeram parte desta conquista! Obrigada pelos momentos de estudos, risadas e imensa ajuda em todos os momentos. Em especial, Alane, minha amiga mais do que irmã, que em todo tempo me incentivou com suas palavras de apoio, incentivo e principalmente do Reino de Deus, sempre orando por mim e me ajudando!

À minha eterna amiga e irmã em Cristo, Nilda! Aprendi a ser otimista e firme com suas palavras de incentivo e amor. Obrigada por você e sua família fazerem parte da minha vida!

Aos meus queridos irmãos em Cristo da Igreja Batista Barão Geraldo, os quais tive o privilégio de conhecer, especialmente as minhas queridas amigas Jesuina e Itaci. Obrigada à IBBG por fazer parte desta igreja na etapa dos meus estudos. Aprendi muito com todos vocês! Foram momentos de muita alegria, orações e estudo sobre a verdade do evangelho de Jesus Cristo, o nosso Senhor e Salvador.

Aos irmãos da Igreja da Praça, Pastor Alexadre, Aleksandra, Rodolfo, Fernanda, Wanda, Flávia, Raulf e Antônio pelo apoio, orações e estudo da palavra de Deus.

Aos amigos da Casa Douglas: Lois Douglas, Juari, Davi, Maria e Rute. Obrigada pelo apoio nos momentos que mais precisei, sou eternamente grata à todos vocês pelo carinho e atenção.

À todos os professores e funcionários da FEA que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho se concretizasse. Principalmente ao Jonas pelo apoio e colaboração.

Aos secretários, Cosme, Marcos, Andrea e Camila, pelo excelente trabalho e por me ajudar com a solução dos problemas e burocracias.

Ao bandeirão do RU/UNICAMP pela feijoada maravilhosa!

À CAPES pelo apoio financeiro durante todo este período de Doutorado.

Aos membros da banca examinadora, pelas contribuições, sugestões e atenção dedicada ao aperfeiçoamento deste estudo.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram deste trabalho, deixo o meu muito obrigada.

RESUMO

A semente de chia é uma importante fonte lipídica e de compostos fenólicos, e o seu óleo possui elevado teor de ácido graxo α -linolênico. Os extratos metanólicos da semente, farinha fibrosa e óleo de chia foram analisados, e os principais compostos fenólicos identificados foram o ácido caféico e danshensu, e os derivados do danshensu, tais como o ácido rosmarínico e o ácido salvianólico. Os efeitos da ingestão da dieta contendo 7 % de óleo, 20 % de semente e 20 % de farinha fibrosa de chia foram avaliados quanto aos níveis séricos de colesterol total e perfil dos ácidos graxos no tecido hepático dos camundongos Balb/C saudáveis. Os camundongos que consumiram dieta com 7 % de óleo e 20 % de semente apresentaram redução significativa nos níveis séricos de colesterol total, 19,76 % e 12,88 %, respectivamente. A composição dos ácidos graxos no tecido hepático dos animais apresentou significativamente elevado teor de ácido α -linolênico para o grupos que consumiram dieta com semente e óleo de chia. Avaliou-se os efeitos do consumo da dieta por camundongos Balb/C machos, contendo 10 %, 15 % e 20 % de semente e farinha fibrosa de chia, e dieta contendo 5 %, 6 % e 7 % de óleo de chia, em modelo de tumor sólido de Ehrlich no período de 56 dias. Os animais tratados com as dietas contendo 10 %, 15 % e 20 % de semente de chia e 20 % de farinha fibrosa chia apresentaram redução média de 24 % da massa tumoral. Adicionalmente, o consumo do óleo de chia na dieta reduziu significativamente o crescimento da massa tumoral no modelo de tumor sólido de Ehrlich. O consumo das dietas com 5 %, 6 % e 7 % de óleo de chia apresentaram redução média de 55 % da massa tumoral. Animais tratados com as dietas contendo óleo de chia apresentaram menores tumores sendo a sua atividade antitumoral semelhante ao do quimioterápico doxorrubicina. Apesar da potente ação antitumoral, o consumo diário da dieta contendo óleo de chia não promoveu sinais de toxicidade, diferente do grupo tratado com doxorrubicina, que apresentou alterações nos parâmetros hematológicos. Este estudo fornece novas informações sobre os principais ácidos fenólicos presentes na semente de chia, os quais são importantes fontes de antioxidantes naturais. A semente e óleo de chia são uma importante fonte de ômega 3 e uma alternativa de consumo para contribuir na redução dos níveis séricos de colesterol total. O consumo da semente e do óleo de chia na dieta, especialmente contendo 10 %, 15 % e 20 % de semente, e 5 %, 6 % e 7 % de óleo, apresentaram potencial ação preventiva no crescimento de tumores, e ambos não apresentaram efeitos colaterais nos camundongos. Um dos grandes desafios no controle do câncer é a busca por novos agentes preventivos, a semente e óleo de chia, certamente representam um potencial a ser explorado e estudos futuros devem ser realizados a fim de confirmar seu potencial preventivo em modelos crônicos de carcinogênese.

Palavras-chave: Chia; compostos fenólicos; ácidos graxos; colesterol; câncer.

ABSTRACT

Chia seed is an important source of lipids and phenolic compounds, and its oil has high level of α -linolenic acid. The methanolic extracts corresponding to the chia seed, fiber flour and oil were analyzed, and the main phenolic compounds identified in extracts were the caffeic acid and danshensu, and danshensu derivatives, such as rosmarinic acid and salvianolic acid. The effects of dietary intake containing 7 % chia oil, 20 % chia seed and 20 % chia fiber flour were evaluated for serum levels of total cholesterol and fatty acid profile in the hepatic tissue of healthy Balb/C mice. Mice consuming 7 % oil and 20 % seed showed a significant reduction in serum levels of total cholesterol, 19.76 % and 12.88 %, respectively. The composition of the fatty acids in the hepatic tissues of the animals presented significantly high α -linolenic acid content for the groups that consumed a chia seed and oil diet. The effects of dietary consumption by male Balb/C mice, containing 10 %, 15 % and 20 % of chia seed and fiber flour, and diet containing 5 %, 6 % and 7 % of chia oil, were evaluated in a solid tumor model of Ehrlich in the period of 56 days. The animals treated with diets containing 10 %, 15 % and 20 % chia seed and 20 % chia fiber flour presented an average reduction of 24 % of the tumor mass. Additionally, the consumption of chia oil in the diet significantly reduced tumor mass growth in the Ehrlich solid tumor model. The consumption of diets with 5 %, 6 % and 7 % of chia oil presented an average reduction of 55 % of the tumor mass. The animals treated with the oil-containing diets presented lower tumors and the antitumor activity was similar to that of the chemotherapeutic doxorubicin. Despite the potent antitumor action, the daily consumption of chia oil did not promote signs of toxicity, unlike the doxorubicin group, which presented changes in hematological parameters. This study provides new information on the major phenolic acids present in chia seeds, which are important sources of natural antioxidants. Seed and chia oil are an important source of omega 3 fatty acids and an alternative of intake to contribute in the reduction of the serum levels of total cholesterol. The consumption of chia seed in the diet, especially containing 10 %, 15 % and 20 % of seed, and 5 %, 6 % and 7 % of chia oil, presented potential preventive action on the growth of tumors, and both had no side effects in mice. One of the major challenges in cancer control is the search for new preventive agents, chia seed and oil, certainly represent a potential to be explored and future studies should be carried out to confirm its potential preventive in chronic models of carcinogenesis.

Keywords: Chia; phenolic compounds; fatty acids; cholesterol; cancer.

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO GERAL	17
REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO I	22
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
1. Chia	24
2. Produtos da chia	26
3. Compostos fenólicos	28
4. Atividade antioxidante	31
5. Atividade antitumoral	33
6. Referências	36
CAPÍTULO II	42
COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DA SEMENTE, FARINHA FIBROSA E ÓLEO DE CHIA (<i>Salvia hispanica</i> L.) POR LC-DAD-ESI-MS/MS	
RESUMO	44
ABSTRACT	45
1. INTRODUÇÃO	46
2. MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1 Reagentes e padrões	47
2.2 Matérias-primas	48
2.3 Composição centesimal	48
2.4 Minerais	49
2.5 Índice de peróxido	50
2.6 Índice de acidez	50
2.7 Determinação de cor	50
2.8 Índice de iodo	51
2.9 Índice de saponificação	51
2.10 Perfil dos ácidos graxos	51
2.11 Tocoferóis	51
2.12 Carotenóides	52
2.13 Malondialdeído	53
2.14 Extração dos compostos fenólicos totais	53

2.14.1 Extrato bruto da semente e farinha de chia	53
2.14.2 Extrato bruto do óleo de chia	54
2.14.3 Extrato hidrolisado da semente, farinha e óleo de chia	54
2.15 Condições cromatográficas para identificação dos compostos fenólicos	55
2.15.1 HPLC-DAD-ESI-MS/MS	55
2.15.2 HPLC-DAD-ED	55
2.16 Determinação do conteúdo de fenólicos totais	56
2.17 Determinação da atividade antioxidante	57
2.17.1 Ensaio FRAP	57
2.17.2 Ensaio ORAC	57
2.18 Análise dos resultados e análises estatísticas	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.1 Caracterização físico-química e química	58
3.2 Composição dos ácidos graxos	64
3.3 Composição dos tocoferóis	66
3.4 Composição dos minerais	67
3.5 Identificação dos compostos fenólicos por HPLC-DAD-ESI-MS/MS	69
3.5.1. Álcool fenólico	75
3.5.2. Ácidos orgânicos	75
3.5.3. Ácidos hidroxicinâmicos	75
3.5.4. Ácido hidroxibenzóico e hidroxibenzaldeído	83
3.5.5. Terpeno	84
3.6 Atividade antioxidante e eletroquímica	84
4. CONCLUSÃO	89
5. REFERÊNCIAS	90
CAPÍTULO III	100
EFEITOS DO CONSUMO DA SEMENTE, FARINHA FIBROSA E ÓLEO DE CHIA (<i>Salvia hispanica</i> L.) NOS NÍVEIS DE LIPÍDEOS HEPÁTICOS E COLESTEROL SÉRICO EM CAMUNDONGOS SAUDÁVEIS	
RESUMO	102
ABSTRACT	103
1. INTRODUÇÃO	104
2. MATERIAL E MÉTODOS	105
2.1 Reagentes	105
2.2 Equipamentos	105
2.3 Animais	105
2.4 Elaboração das dietas	106

2.5 Análises das dietas	106
2.5.1 Composição centesimal	106
2.5.2 Perfil dos ácidos graxos	106
2.6 Compostos fenólicos totais na semente, farinha e óleo de chia	107
2.6.1 Extração dos compostos fenólicos da semente e farinha de chia	107
2.6.2 Extração dos compostos fenólicos do óleo de chia	108
2.6.3 Determinação do conteúdo fenólico total	108
2.7 Determinação de fibra solúvel e insolúvel na semente e farinha de chia	108
2.8 Avaliação da toxicidade aguda	109
2.8.1 Avaliação da toxicidade aguda do óleo de chia	109
2.8.2 Avaliação da toxicidade aguda da semente e farinha fibrosa de chia	109
2.9 Efeitos das dietas contendo óleo, semente e farinha de chia em animais sadios.	109
2.10 Avaliações dos animais	110
2.10.1 Massa corporal	111
2.10.2 Glicemia	111
2.11 Eutanásia dos animais	111
2.11.1 Avaliação dos parâmetros sanguíneos	112
2.11.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos	112
2.11.3 Peso relativo dos tecidos	112
2.11.4 Atividade antioxidante nos rins e coração	112
2.11.4.1 Preparo do homogenato	112
2.11.4.2 Ensaio FRAP	113
2.11.4.3 Ensaio ORAC	113
2.11.5 Análises hepáticas	113
2.11.5.1 Teor de lipídeos, análise de colesterol total e triglicérides	113
2.11.5.2 Perfil dos ácidos graxos no fígado	114
2.12 Análise estatística	115
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	115
3.1 Análises da dietas	114
3.2 Avaliação da toxicidade aguda	117
3.3 Efeitos das dietas contendo óleo, semente e farinha de chia em animais sadios.	118
3.3.1 Consumo alimentar e massa corporal	118
3.3.2 Avaliação da massa relativa dos tecidos	120
3.3.3 Parâmetros hematológicos e bioquímicos	121
3.3.4 Análise dos tecidos	126

3.3.4.1 Rins e coração	126
3.3.4.2 Fígado	128
4. CONCLUSÃO	132
5. REFERÊNCIAS	133
CAPÍTULO IV	138
EFEITO DA SEMENTE E FARINHA FIBROSA DE CHIA (<i>Salvia hispanica</i> L.) NO DESENVOLVIMENTO DO TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS	
RESUMO	140
ABSTRACT	141
1. INTRODUÇÃO	142
2. MATERIAL E MÉTODOS	143
2.1 Reagentes	143
2.2 Equipamentos	143
2.3 Animais	144
2.4 Elaboração das dietas	144
2.5 Análises das dietas	145
2.5.1 Composição centesimal	145
2.5.2 Perfil dos ácidos graxos	145
2.6 Compostos fenólicos totais na semente e farinha de chia	145
2.6.1 Extração dos compostos fenólicos	145
2.6.2 Determinação do conteúdo fenólico total	146
2.7 Determinação de fibra solúvel e insolúvel na semente e farinha de chia	146
2.8 Tumor sólido de Ehrlich	146
2.8.1 Preparação das células	147
2.8.2 Inoculação das células tumorais no dorso dos animais	147
2.9 Delineamento experimental antitumoral	148
2.10 Avaliações dos animais	149
2.10.1 Massa corporal	149
2.11 Eutanásia dos animais	150
2.11.1 Avaliação dos parâmetros sanguíneos	150
2.11.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos	150
2.11.3 Peso relativo dos tecidos	150
2.11.4 Análises histológicas do tumor	151
2.11.4.1 Área de necrose	151
2.11.5 Análises hepáticas	151
2.11.5.1 Teor de lipídeos totais	151

2.11.5.2 Análise do colesterol total e triglicérides	152
2.12 Análise estatística	152
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	152
3.1 Dietas experimentais	152
3.2 Ensaio antitumoral	155
3.2.1 Massa corporal e parâmetros de consumo	155
3.2.2 Atividade antitumoral	158
3.2.3 Parâmetros hematológicos e bioquímicos	164
3.2.4 Análise macroscópica dos tecidos	167
4. CONCLUSÃO	172
5. REFERÊNCIAS	173
CAPÍTULO V	178
EFEITO DO ÓLEO DE CHIA (<i>Salvia hispanica</i> L.) RICO EM ÁCIDO α -LINOLÊNICO NO DESENVOLVIMENTO DO TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS	
RESUMO	180
ABSTRACT	181
1. INTRODUÇÃO	182
2. MATERIAL E MÉTODOS	183
2.1 Reagentes	183
2.2 Equipamentos	183
2.3 Animais	184
2.4 Elaboração das dietas	184
2.5 Análises das dietas	185
2.5.1 Composição centesimal	185
2.5.2 Perfil dos ácidos graxos	185
2.6 Tumor sólido de Ehrlich	185
2.6.1 Preparação das células	185
2.6.2 Inoculação das células tumorais no dorso dos animais	186
2.6.3 Delineamento experimental antitumoral	186
2.7 Avaliações dos animais	188
2.7.1 Massa corporal	188
2.7.2 Eutanásia dos animais	188
2.7.3 Avaliação dos parâmetros sanguíneos	189
2.7.4 Avaliação dos parâmetros bioquímicos	189
2.7.5 Peso relativo dos tecidos	189
2.7.6 Análises histológicas do tumor	190

2.7.4.6.1 Área de necrose	190
2.8 Análises hepáticas	190
2.8.5.1 Teor de lipídeos totais	190
2.8.5.2 Análise do colesterol total e triglicérides	191
2.9 Análise estatística	191
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	191
3.1 Dietas experimentais	191
3.2 Ensaio antitumoral	193
3.2.1 Massa corporal e parâmetros de consumo	193
3.2.2 Atividade antitumoral	195
3.2.3 Parâmetros hematológicos e bioquímicos	203
3.2.4 Análise macroscópica dos tecidos	206
4. CONCLUSÃO	211
5. REFERÊNCIAS	212
DISCUSSÃO GERAL	219
CONCLUSÃO GERAL	222
REFERÊNCIAS GERAIS	223
ANEXO 1	246
ANEXO 2	247
ANEXO 3	248
ANEXO 4	249

INTRODUÇÃO GERAL

A ingestão dos compostos bioativos constitui uma medida protetora contra o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Os compostos bioativos interferem em alvos fisiológicos específicos, modulando a defesa antioxidante, principalmente defesa frente à processos inflamatórios e mutagênicos, os quais estão relacionados à várias doenças, e por isso são essenciais para a manutenção da saúde. Os compostos bioativos podem ser provenientes de produtos de origem animal e vegetal, tais como os ácidos graxos ômega 3, ácidos graxos conjugados, carotenóides, fitoesteróis, terpenos e compostos fenólicos (Oliveira & Bastos, 2011).

Os compostos fenólicos podem proteger os constituintes celulares contra os danos oxidativos e, portanto, limitar o risco de doenças degenerativas associadas ao estresse oxidativo. Estudos experimentais, de fato apoiam fortemente o papel dos compostos fenólicos na prevenção de doenças cardiovasculares, osteoporose, diabetes *mellitus*, doenças neurodegenerativas e câncer (D'Archivio *et al.*, 2007; Weng & Yen, 2012). Do mesmo modo, os ácidos graxos poli-insaturados, especificamente os ácidos graxos ômega 3, podem contribuir para redução dos processos inflamatórios crônicos e exercer efeitos antitumorais (Espada *et al.*, 2007; Vendramini-Costa & Carvalho, 2012; Miccadei *et al.*, 2016).

Estudos relatam que o aumento na incidência de câncer pode estar relacionado à mudança nos hábitos alimentares, principalmente o aumento do consumo de alimentos com elevados teores de açúcares simples, gorduras saturadas e com baixos teores de fibras e compostos bioativos, além da maior exposição a poluentes e do contato com compostos carcinogênicos; entretanto seja por esses fatores e outros, essa patologia é hoje um dos maiores problemas de saúde pública (Monteiro *et al.*, 2014; Siegel *et al.* 2016; Wang *et al.*, 2016; Miccadei *et al.*, 2016).

Os relatos de maior incidência de câncer em ambos os sexos ocorrem em países com alta renda, tais como a América do Norte e Europa Ocidental, juntamente com o Japão, Coreia, Austrália e Nova Zelândia (Stewart & Wild, 2014). As taxas intermediárias ocorrem na América Central e do Sul, Europa Oriental e em grande parte do sudeste Asiático, incluindo China, porém os relatos de menor incidência foram observados em grande parte da África, Oeste e Sul da Ásia, incluindo a Índia (Stewart & Wild, 2014; NCI, 2017).

Atualmente, os tipos de câncer com maior incidência no mundo são os de mama (18,73 %), pulmão (16,49 %), próstata (11,96 %) e o colorretal (10,03 %), com 16,4 %, 70,1 %, 16,6 % e 37,3 % de mortalidade, respectivamente (NCI, 2017; IARC, 2011). No

Brasil, estima-se que para o ano de 2017 serão aproximadamente 596.070 novos casos de cânceres, sendo que os tipos mais incidentes são o câncer de próstata, pulmão, estômago, cólon e reto, para o sexo masculino, e câncer de mama, colo do útero, pulmão, cólon e reto para o sexo feminino (INCA, 2017).

A incidência de câncer é substancial em países de todos os níveis de renda, entretanto a disparidade na incidência dos diferentes tipos de câncer entre os países é explicada pelos fatores de riscos e sua detecção, tipo de comportamento cultural e individual, hábito alimentar e na disponibilidade de tratamentos (Torre *et al.*, 2016). Neste contexto, de acordo com Torre *et al.* (2016) e Ferlay *et al.* (2012), os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer são o tabagismo (pulmão, colorretal, estômago e fígado), alcoolismo (estômago, colorretal e fígado), sobrepeso, obesidade, sedentarismo (mama e colorretal) e infecções (fígado, estômago, colorretal, cervical).

Estudos usando modelos pré-clínicos e clínicos indicaram que os antioxidantes naturais promovem redução do risco de câncer, e dados epidemiológicos sugerem que pessoas que consomem dietas com antioxidantes naturais, provenientes de frutas e vegetais, têm um menor risco de desenvolver doenças crônicas do que aquelas que ingerem baixas quantidades de frutas e vegetais (Shanmugam *et al.*, 2016; Guamán-Ortiz *et al.*, 2017; Prasad *et al.*, 2017). Dessa forma, estudos com óleos vegetais, sementes oleaginosas e extratos derivados de vegetais, tais como frutas e cereais com elevado teor de compostos bioativos têm focado na avaliação dos efeitos antitumorais devido às suas ações anti-inflamatórias e antioxidantes (Espada *et al.*, 2007; Miranda-Vilela *et al.*, 2014; Roleira *et al.*, 2015).

Pesquisas recentes relatam que a ingestão diária de componentes bioativos presentes nas sementes de chia, entre eles os compostos fenólicos e ácido graxo α -linolênico, promovem redução na incidência de doenças cardiovasculares (Ayerza & Coates, 2005; Ayerza & Coates, 2007; Croft, 2016), efeito hepatoprotetor (Poudyal *et al.*, 2012), controle da diabetes (Ho *et al.*, 2013) e efeito protetor contra o estresse oxidativo em doenças relacionadas à obesidade (Marineli *et al.*, 2015).

O crescente interesse no estudo da semente de chia tem ocorrido devido aos seus benefícios nutricionais e propriedades funcionais, os quais têm sido relacionados à alguns dos seus componentes, entre eles o seu elevado teor de lipídeos, que contém ácidos graxos poli-insaturados, principalmente ácido graxo α -linolênico, e baixo conteúdo de ácidos graxos saturados (Ayerza & Coates, 2009; Porras-Loaiza *et al.*, 2014). Além disso, o alto teor de fibra alimentar, proteínas e minerais despertam o interesse da comunidade científica e dos seus consumidores (Ayerza & Coates, 2011; Ayerza, 2013; Marineli *et al.*, 2014).

Tendo em vista o aumento do consumo das sementes de chia no Brasil, e as perspectivas dos benefícios à saúde que o seu consumo regular pode trazer, são necessários mais estudos científicos que contribuam para o conhecimento das propriedades nutricionais e biológicas da mesma, bem como a investigação dos compostos bioativos responsáveis por essa atividade e o seu mecanismo de ação. A caracterização dos compostos fenólicos e determinação da atividade antioxidante da semente de chia e dos seus produtos podem fornecer informações importantes a respeito dos benefícios à saúde decorrentes da sua ingestão, que podem incluir a prevenção de doenças relacionadas ao desequilíbrio metabólico, estresse oxidativo, comprometimento imunitário e inflamações crônicas, dentre elas o câncer.

Os esforços depositados na busca por agentes preventivos e terapêuticos para a prevenção e controle do câncer ainda representam um desafio, devido às características peculiares de cada tipo de câncer, mecanismos de resistência e a indução dos efeitos colaterais pelos tratamentos usados atualmente (Vendramini-Costa *et al.*, 2017). Portanto, a busca por novos agentes preventivos, especialmente os de fácil acesso, tais como os agentes incorporados à dieta, se faz necessário, e a semente de chia e seus produtos representam uma alternativa promissora.

Dessa forma, o objetivo principal deste estudo foi avaliar os efeitos do consumo diário da semente, farinha fibrosa e óleo de chia incorporados à dieta na prevenção do crescimento tumoral em camundongos. Além disso, avaliou-se os efeitos das dietas sobre diversos parâmetros hematológicos e bioquímicos, verificando-se assim o impacto nos níveis séricos de colesterol total com a ingestão regular de chia por camundongos saudáveis.

REFERÊNCIAS

- Ayerza, R. (2013). Seed composition of two chia (*Salvia hispanica* L.) genotypes which differ in seed color. *Emir. J. Food Agric.*, 25(7), 495–500.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2005). Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. *Nutrition Research*, 25.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2007). Effect of dietary α -linolenic fatty acid derived from chia when fed as ground seed, whole seed and oil on lipid content and fatty acid composition of rat plasma. *An. of Nut. Metabolism*, 51, 27–34.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2009). Influence of environment on growing period and yield, protein, oil and α -linolenic content of three chia (*Salvia hispanica* L.) selections. *Ind. Cr. and Products*, 30, 321–324.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2011). Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Ind. Cr. and Products*, 34, 1366–1371.
- Croft, K. D. (2016). Dietary polyphenols: antioxidants or not. *Arch. of Bioch. and Biophysics*, 595, 120–124.
- D'Archivio, M., Filesì, C., Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *An. Ist. Super. Sanità*, 43(4), 348–361.
- Espada, C. E., Berra, M. A., Martinez, M. J., Eynard, A. R., & Pasqualini, M. E. (2007). Effect of Chia oil (*Salvia Hispanica*) rich in ω -3 fatty acids on the eicosanoid release, apoptosis and T-lymphocyte tumor infiltration in a murine mammary gland adenocarcinoma. *Prost., Leuk. and Essential Fatty Acids*, 77, 21–28.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2012). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base N°. 11. Available from: <http://globocan.iarc.fr>. [cited 2015, July, 30].
- Guamán-Ortiz, L. M., Orellana, M. I. R., & Ratovitski, E. A. (2017). Natural compounds as modulators of non-apoptotic cell death in cancer cells. *Cur. Genomics*, 18, 132–155.
- Ho, H., Lee, A. S., Jovanovski, E., Jenkins, A. L., DeSouza, R., & Vuksan, V. (2013). Effect of whole and ground Salba seeds (*Salvia Hispanica* L.) on postprandial glycemia in healthy volunteers: a randomized controlled, dose-response trial. *European Journal of Clin. Nutrition*, 67, 786–788.
- IARC (2011). International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <http://www.globocan.iarc.fr>. [Acesso em: 05 de Maio de 2017].
- INCA (2017). Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional do Câncer, Disponível em: ["http://www.inca.gov.br"](http://www.inca.gov.br). [Acesso: 05 de maio de 2017].
- Marineli, R. S., Lenquiste, S. A., Moraes, E. A., & Maróstica Jr., M. R. (2015). Antioxidant potential of dietary chia seed and oil (*Salvia hispanica* L.) in diet-induced obese rats. *F. Res. International*, 76, 666–674.
- Marineli, R. S., Moraes, E. A., Lenquiste, S. A., Godoy, A. T., Eberlin, M. N., & Maróstica Jr., M. R. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *Food Sci. and Technology*, 59, 1304–1310.
- Miccadei, S., Masella, R., Mileo, A. M., & Gessani, S. (2016). ω 3-Polyunsaturated fatty acids as immunomodulators in colorectal cancer: new potential role in adjuvant therapies. *Fr. in Immunology*, 7, 486.
- Miranda-Vilela, A. L., Grisolia, C. K., Longo, J. P. F., Peixoto, R. C. A., Almeida, M. C., Barbosa, L. C. P., Roll, M. M., Portilho, F. A., Estevanato, L. L. C., Bocca, A. L., Bão, S. N., & Lacava, Z. G. M. (2014). Oil rich in carotenoids instead of vitamins C

- and E as a better option to reduce doxorubicin-induced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice: hematological, toxicological and histopathological evaluations. *J. of Nutr. Biochemistry*, 25, 1161–1176.
- Monteiro, L. S., Bastos, K. X., Barbosa-Filho, J. M., Athayde-Filho, P. F., Diniz, M. F. F. M., & Sobral, M. V. (2014). Medicinal plants and other living organisms with antitumor potential against lung cancer. *Evid.-Based Comp. and Alternative Medicine*, ID 604152, 15.
- NCI (2017). National Cancer Institute. Disponível em: <https://www.cancer.gov/>. [Acesso em 05 de maio de 2017].
- Oliveira, D. M., & Bastos, D. H. M. (2011). Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Quim. Nova*, 34(6), 1051–1056.
- Porras-Loaiza, P., Jiménez-Munguía, M. T., Sosa-Morales, M. E., Palou, E., & Lopez-Malo, A. (2014). Physical properties, chemical characterization and fatty acid composition of Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Int. J. of F. Sci. and Technology*, 49, 571–577.
- Poudyal, H., Panchal, S. K., Waanders, J., Ward, L., & Brown, L. (2012). Lipid redistribution by α -linolenic acid-rich chia seed inhibits stearyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. *J. of Nutr. Biochemistry*, 23, 153–162.
- Prasad, S., Gupta, S. C., & Tyagi, A. K. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: role of antioxidative nutraceuticals. *Can. Letters*, 387, 95–105.
- Roleira, F. M. F., Tavares-da-Silva, E. J., Varela, C. L., Costa, S. C., Silva, T., Garrido, J., & Borges, F. (2015). Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties. *F. Chemistry*, 183, 235–258.
- Shanmugam, M. K., Lee, J. H., Chai, E. Z. P., Kanchi, M. M., Kar, S., Arfuso, F., Dharmarajan, A., Kumar, A. P., Ramar, P. S., Looi, C. Y., Mustafa, M. R., Tergaonkar, V., Bishayee, A., Ahn, K. S., & Sethi, G. (2016). Cancer prevention and therapy through the modulation of transcription factors by bioactive natural compounds. *Sem. in Can. Biology*, 40-41, 35–47.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer Statistics. *CA Can. J Clin* 66, 66(1), 7–30.
- Stewart, B. W., & Wild, C. P. ((2014)). World cancer report (WHO). Disponível em: <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>. [Acesso em: 01 de fevereiro de 2017].
- Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2016). Global cancer incidence and mortality rates and trends – an update. *Can. Epi. Biom. Prev.*, 25(1), 16–27.
- Vendramini-Costa, D. B., & Carvalho, J. E. (2012). Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Cur. Phar. Design*, 18, 3831–3852.
- Vendramini-Costa, D. B., Francescone, R., Posocco, D., Hou, V., Dmitrieva, O., Hensley, H., Carvalho, J. E., Pilli, R. A., & Grivennikov, S. I. (2017). Anti-inflammatory natural product goniotalamin reduces colitis-associated and sporadic colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 38(1), 51–63.
- Wang H, Yin Y, Wang P, Xiong C, Huang L, Li S, Li X, & L., F. (2016). Current situation and future usage of anticancer drug databases. *Apoptosis*, 21(7), 778–794.
- Weng, C.-J., & Yen, G.-C. (2012). Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Can. Tr. Reviews*, 38, 76–87.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**CHIA (*Salvia hispanica* L.): COMPOSIÇÃO QUÍMICA, COMPOSTOS FENÓLICOS,
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTITUMORAL**

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CHIA (*Salvia hispanica* L.): COMPOSIÇÃO QUÍMICA, COMPOSTOS FENÓLICOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTITUMORAL

Sheila Cristina de Oliveira Alves¹, Débora Barbosa Vendramini Costa², Marcelo Alexandre Prado¹

¹*Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6121, 13083-862, Campinas, SP, Brasil.*

²*Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brasil.*

1. Chia

A *Salvia hispanica* L. é uma planta herbácea bianualmente cultivada, pertencente à família *Lamiaceae*, superdivisão da *Spermatophyta* e Reino *Plantae* (Mohd Ali *et al.*, 2012). A *Salvia hispanica* L., conhecida popularmente como chia, é nativa do sul do México e norte da Guatemala, sendo um importante alimento básico cultivado no período Pré-Colombiano, pois os antigos Astecas e outros grupos culturais na Mesoamérica cultivavam e colhiam as sementes de chia extensivamente, e seu uso na culinária ocorria na forma de grãos inteiros e triturados (Cahill, 2003).

A planta da chia pode crescer até 1 metro de altura, possui folhas dispostas opostas, sendo suas flores roxas ou brancas, com tamanho entre 3 a 4 mm, e as partes fundidas da flor contribuem para uma taxa elevada de auto-polinização (Mohd Ali *et al.*, 2012). A cor da semente varia entre preto, cinza e preto manchado com branco, a sua forma é oval, com comprimento variando de 1,90 a 2,37 mm e diâmetro de 1,21 a 1,43 mm (Ixtaina *et al.*, 2008), conforme apresentado na **Figura 1**.



Figura 1. Plantação de chia (a) e semente de chia (b). Fonte: Tosco (2004) e Coelho & Salas-Mellado (2014).

Atualmente, a chia é cultivada na Argentina, Colômbia, Equador, Peru, Bolívia, Paraguai e Austrália, para fins comerciais das suas sementes (Coates & Ayerza, 1996; Busilacchi *et al.*, 2013). As sementes embebidas em água, suco de frutas e sopas é a forma mais consumida nas regiões do México (Cahill, 2003; Reyes-Caudillo, 2008). No Brasil a chia tem sido consumida juntamente com cereais matinais, frutas, iogurtes e bebidas refrescantes, tais como sucos e vitaminas de frutas.

A semente de chia é um pseudocereal, não contém glúten, e por isso tem sido incorporada em vários tipos de alimentos, bebidas e em formulações de farinhas mistas para

indústria de panificação. Além disso, as sementes têm sido utilizadas como suplemento nutricional, bem como na fabricação de barras de cereais e biscoitos nos Estados Unidos, América Latina e Austrália (Coelho & Salas-Mellado, 2014).

A semente de chia possui cerca de 21,0 a 35,0 g de óleo/100 g, sendo que os ácidos graxos presentes no seu óleo são altamente insaturados. Os ácidos graxos essenciais são os principais componentes no óleo de chia, o ácido linoléico (17,0 a 20,3 g/100 g óleo) e ácido α -linolênico (59,9 a 67,8 g/100 g óleo), de acordo com Coates & Ayerza (1996), Álvarez-Chávez *et al.* (2008), Ayerza & Coates (2007; 2009), Peiretti & Gai (2009), Ixtaina *et al.* (2011), Marineli *et al.* (2014) e Boidora *et al.* (2017).

A qualidade nutricional da semente de chia está diretamente relacionada com seu estágio de maturação, pois com a maturidade crescente, ocorrem reduções nos teores de ácidos graxos, principalmente o ácido α -linolênico, e no conteúdo de proteína bruta (Peiretti & Gai, 2009). A maturidade, de fato, é o fator mais importante que afeta a qualidade das sementes, devido à diferença de proporção entre os componentes do tecido vegetal, o aumento da lignificação durante o desenvolvimento da semente e o aumento das frações de fibra nos tecidos vegetais (Morrison, 1980; Wilson *et al.*, 1991; Peiretti & Gai, 2009).

O teor de proteína bruta varia na semente de 15,95 a 26,03 g/100 g (Ayerza & Coates, 2011; Ayerza, 2013; Marineli *et al.*, 2014), sendo o seu teor maior do que em outras culturas tradicionais de cereais, como trigo (11,00 g/100 g), milho (8,80 g/100 g), arroz (13,30 g/100 g), aveia (14,92 g/100 g), cevada (19,04 g/100 g) e sorgo (12,10 g/100 g) (Ragaee *et al.*, 2006; Rupollo *et al.* 2006). Embora a chia não seja cultivada comercialmente como fonte de proteína, seu perfil de aminoácidos apresenta-se balanceado, não sendo observado fatores limitantes para a dieta de um adulto, pois a semente apresenta teores consideráveis de treonina (5,91 mg/g), lisina (7,65 mg/g) e leucina (9,75 mg/g), e elevados teores de arginina (16,34 mg/g), asparagina (13,28 mg/g), e glutamina (25,95 mg/g), conforme relatado por Ayerza (2013).

Além das proteínas, a semente de chia apresenta 90 a 94 g/100 g de matéria seca, sendo a mesma composta por carboidratos (26 a 41g/100 g), fibra alimentar (18 a 38 g/100 g), cinzas (4 a 5 g/100 g), minerais e vitaminas, de acordo com Mohd Ali *et al.* (2012), Marineli *et al.* (2014) e Silva *et al.* (2017). Além dos nutrientes presentes, quando a semente de chia é umidificada, ocorre a formação de um gel transparente mucilaginoso que permanece firmemente ligado à ela, pois no seu epicarpo encontram-se células que produzem mucilagem quando umedecidas (Ixtaina *et al.*, 2008). A mucilagem formada é um exsudato natural,

composto principalmente por xilose, glicose e ácido glucurônico, formando um polissacarídeo ramificado de alto peso molecular (Lin *et al.*, 1994, Muñoz *et al.*, 2012).

Reyes-Caudillo *et al.* (2008) relataram que as sementes de chia contêm cerca de 5 a 6 % de mucilagem, enquanto Muñoz *et al.* (2012) citaram 7 % de mucilagem. Coorey *et al.* (2014) analisaram a mucilagem formada na semente de chia e relataram que a mesma possui 58 % de fibra bruta e 34 % de carboidratos. A mucilagem extraída das sementes de chia tem um grande potencial em formulações alimentares como agente espessante, emulsificante e estabilizante.

O teor de fibra alimentar na semente varia de 18 a 38 g/100 g, sendo a maior parte deste conteúdo representado por fibra alimentar insolúvel (14 a 35 g/100 g). A fibra alimentar inclui celulose, hemicelulose, lignina, pectinas, gomas, mucilagem e outros polissacarídeos e oligossacarídeos associados, sendo resistentes à digestão e absorção no intestino delgado humano e com fermentação completa ou parcial no intestino grosso (Esposito *et al.*, 2005; Capitani *et al.*, 2012). As fibras solúveis são fermentadas no cólon, enquanto que as fibras insolúveis têm ação na formação do bolo fecal e possuem fermentação limitada no cólon (Anderson *et al.*, 2009).

Além disso, as fibras alimentares têm um papel essencial na saúde intestinal, nos efeitos nutricionais e fisiológicos dos consumidores, pois estão significativamente associadas à um menor risco de desenvolver doenças coronárias, diabetes e obesidade (Willem van der Kamp *et al.*, 2010).

2. Produtos da chia

O óleo de chia pode ser obtido por diferentes métodos, tais como extração com solvente, por prensagem e extração supercrítica (Martínez *et al.*, 2012). Na indústria, o óleo é obtido por prensagem a frio da semente de chia por um processo utilizando expeller, para obter um óleo com parâmetros de qualidade e nutricionais, de acordo com os valores determinados pela legislação Codex Alimentarius, contudo a prensagem a frio resulta em uma extração parcial do óleo (Ixtaina *et al.*, 2010).

O índice de acidez e o índice de peróxido são descritos como parâmetros referenciais para determinar a qualidade da conservação dos óleos. De acordo com o padrão de qualidade dos óleos vegetais, a legislação determina valor máximo de 3,30 g ácido oléico/100 g óleo e 20 mEqO₂/kg óleo, respectivamente (Codex Alimentarius, 2003). Ixtaina *et al.* (2012) relataram o valor de 1,30 g ácido oléico/100 g óleo para o índice de acidez e 1,00

mEqO₂/kg óleo para índice de peróxido no óleo de chia comercial obtido pelo sistema de prensagem a frio, método atualmente utilizado para extração do óleo de chia comercializado.

A comercialização do óleo da chia vem crescendo anualmente devido ao seu elevado conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA). Os PUFA desempenham um papel importante na prevenção de doenças crônicas, tais como hipertensão, doenças coronárias, diabetes e câncer (Poudyal *et al.*, 2012).

Os PUFA variam no óleo de chia na faixa de 80,60 a 84,09 g/100 g, e os principais ácidos graxos identificados são o linoléico e α -linolênico (Álvarez-Chávez *et al.*, 2008; Ixtaina *et al.*, 2011; Marineli *et al.*, 2014; Bodoira *et al.*, 2017). O óleo de chia pode apresentar elevada variação no conteúdo dos PUFA, e essas diferenças são atribuídas às diferentes condições ambientais, tais como temperatura, luz, tipo de solo e nutrientes disponíveis. Ayerza (1995) relatou variações nas concentrações de ácido oléico, linoléico e linolênico no óleo devido à localização do cultivo da semente, enquanto Ayerza & Coates (2004) reportaram que as sementes de chia cultivadas em diferentes ecossistemas da América do Sul apresentaram diferenças significativas nos teores de óleo e na composição dos ácidos graxos. Geralmente o conteúdo do ácido α -linolênico varia na faixa de 60,20 a 67,80 g/100 g, conforme descrito por Coates & Ayerza (1996); Álvarez-Chávez *et al.* (2008); Peiretti & Gai (2009); Ixtaina *et al.*, (2011); Marineli *et al.* (2014) e Boidora *et al.* (2017).

Além disso, os óleos comestíveis apresentam fitoesteróis, os quais têm sido amplamente estudados por seus efeitos hipocolesterolêmico e anticarcinogênico (Pelletier *et al.*, 1995; Phillips *et al.*, 2002; Kozłowska *et al.*, 2016). Geralmente, os esteróis estão principalmente na forma livre e esterificada, sendo que os esteróis livres podem ter diferentes efeitos fisiológicos (Miettinen & Gylling, 1999; Phillips *et al.*, 2002). No óleo de chia, o teor total de esteróis encontra-se entre 8,15 a 12,60 g/kg óleo, sendo que esses teores são semelhantes ao óleo de prímula (*Oenothera biennis*), em que o teor total de esteróis é aproximadamente 10 g/kg óleo, porém em outros óleos não refinados, tais como azeite, amendoim, colza, cártamo, gergelim e girassol, o teor de esteróis totais varia de 1,50 a 8,00 g/kg óleo (Álvarez-Chávez *et al.*, 2008). No óleo de chia, o β -sitosterol (7,96 g/kg) é o componente principal em relação ao estigmastanol (1,83 g/kg) e ao estigmasterol (2,77 g/kg), em geral, o β -sitosterol representa cerca de 60 % dos esteróis totais em óleos vegetais brutos (Álvarez-Chávez *et al.*, 2008).

Os óleos vegetais são fontes principais de tocoferóis, os quais são antioxidantes naturais e desempenham funções importantes na reprodução e nos mecanismos antioxidantes dos tecidos animais e vegetais (Guinazi *et al.*, 2009). O óleo de chia apresenta o teor de

tocoferóis totais entre 443 a 480 mg/kg, sendo o γ -tocoferol o mais abundante, na faixa de 415 a 463 mg/kg (Ciftci *et al.*, 2012; Ixtaina *et al.*, 2012; 2015).

Após a extração do óleo de chia por presagem a frio, a fração da semente residual é seca, triturada a 435 μ m, obtendo assim a farinha fibrosa de chia. Portanto, a farinha é o resíduo do processo de extração do óleo da semente de chia. A farinha fibrosa possui um elevado conteúdo de proteínas (32,0 a 35,0 g/100 g) e fibra bruta (21,0 a 29,0 g/100 g), e consideráveis teores de lipídeos (8,7 a 14,0 g/100 g), mesmo após o seu processamento (Capitani *et al.*, 2012; Segura-Campos *et al.*, 2013; Coorey *et al.*, 2014).

De acordo com Capitani *et al.* (2012), os teores de fibras alimentares na farinha fibrosa variam de 44 a 46 g/100 g, sendo a maior parte deste conteúdo representado por fibra alimentar insolúvel (40 a 41 g /100 g). As fibras insolúveis contribuem para o aumento do volume do bolo fecal, redução do tempo de trânsito intestinal, retardo da absorção de glicose e da hidrólise do amido. O consumo elevado de fibra alimentar solúvel reduz as respostas pós-prandiais da glicose, após as refeições ricas em carboidratos, bem como a redução dos níveis de LDL (*Low Density Lipoprotein*)-colesterol e colesterol total (Weickert & Pfeiffer, 2008).

Além disso, Capitani *et al.* (2012) relatam que a farinha fibrosa de chia apresenta uma elevada capacidade de reter e absorver água, podendo ser utilizada como um agente emulsificante e estabilizante de emulsões.

A farinha fibrosa é fonte de minerais, apresentando elevado teores de cálcio (5615,0 mg/kg), magnésio (4624,0 mg/kg), ferro (117,7 mg/kg) e fósforo (9988,5 mg/kg), entretanto baixo teores de cobre (18,7 mg/kg) e zinco (96,0 mg/kg), conforme descrito por Capitani *et al.* (2012). A farinha fibrosa de chia tem sido utilizada como matéria-prima na produção de barra de cereais e biscoitos devido ao seu elevado teor de proteínas e minerais.

3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários presentes nas plantas e englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização, podendo estar presentes na forma livre, ligados à açúcares (glicosídeo) e proteínas em diversas partes das plantas (Acosta-Estrada *et al.*, 2014; Heleno *et al.*, 2015). Os fenólicos são caracterizados pela presença de um ou mais anéis aromáticos ligados à pelo menos um radical hidroxila e/ou outros substitutos, e podem ser divididos de acordo com o número de anéis fenólicos e com as estruturas as quais estão ligados (D'Archivio *et al.*, 2007; Oliveira & Bastos, 2011).

Além disso, os compostos fenólicos desempenham nas plantas um papel importante no crescimento e reprodução, atuam como agentes antipatogênicos e contribuem

também para a pigmentação das plantas. Nos alimentos, os compostos fenólicos podem contribuir no amargor, adstringência, cor, sabor, aroma e estabilidade oxidativa (Naczki & Shahidi, 2006). Dentre os mais de cinco mil fenólicos descritos, destacam-se os flavonóides, cumarinas, taninos, lignanas, estilbenos e ácidos fenólicos, por possuírem atividade antioxidante (Shahidi & Ambigaipalan, 2015), conforme apresentado na **Figura 2**.

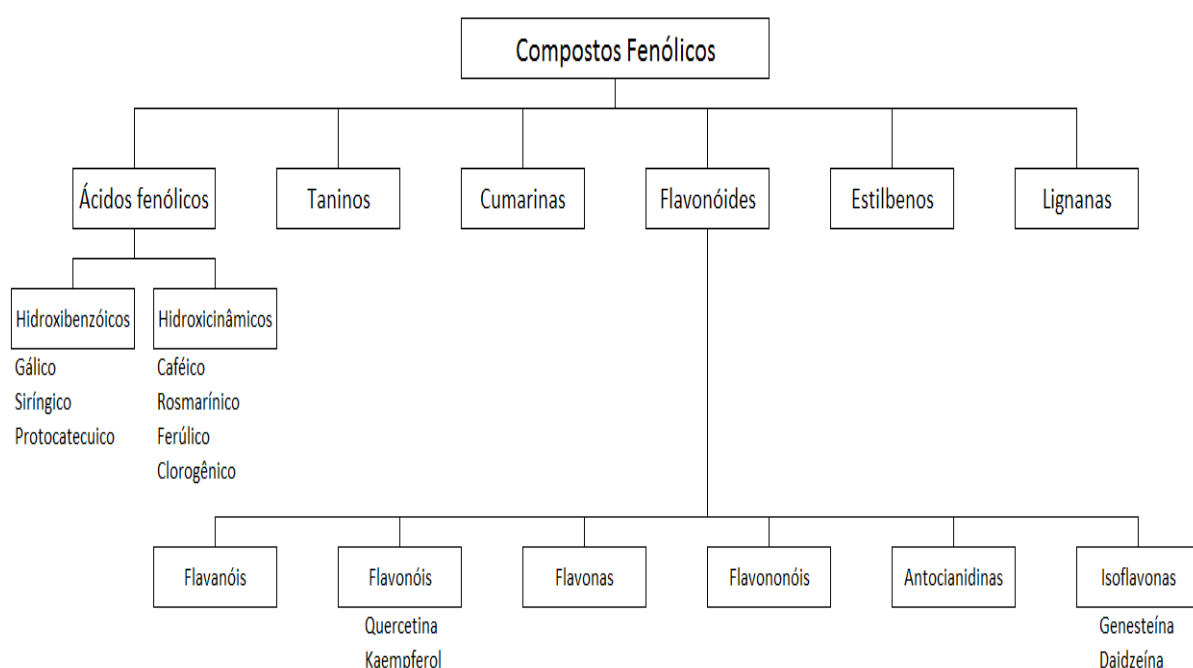


Figura 2. Classificação dos compostos fenólicos. Adaptado de Shahidi & Ambigaipalan (2015).

Os grupos de compostos fenólicos mais abundantes nos alimentos são os flavonóides, os ácidos fenólicos e as lignanas. (D'Archivio *et al.*, 2007; Oliveira & Bastos, 2011). Os ácidos fenólicos e flavonóides geralmente ocorrem nas formas solúveis conjugadas (glicosídeo) e insolúveis (Nardini & Ghiselli, 2004; Acosta-Estrada *et al.*, 2014). Na natureza, os ácidos fenólicos ocorrem principalmente na forma insolúvel ou ligada, enquanto que os flavonóides apresentam-se como glicosídeos, com uma única ou múltiplas porções de açúcares ligados através de um grupo OH (O-glicosídeo) ou através de ligações carbono-carbono (C-glicosídeo).

Os ácidos fenólicos estão presentes em quase todos os alimentos derivados de plantas, representando uma parcela significativa da dieta humana. A ingestão média de ácidos

fenólicos em humanos tem sido relatada como sendo em torno de 200 mg/dia, dependendo dos hábitos e preferências alimentares (Clifford & Scalbert, 2000).

A biodisponibilidade dos ácidos fenólicos é crucial para as suas propriedades biológicas (Heleno *et al.*, 2015). Quando ingeridos na forma livre, os ácidos fenólicos são rapidamente absorvidos pelo intestino delgado e posteriormente conjugados, no entanto, as estruturas químicas dos compostos também podem influenciar nas reações de conjugação, bem como a quantidade de metabólitos formados pela microbiota intestinal no cólon (Scalbert & Williamson, 2000; Heleno *et al.*, 2015).

Após ingestão e absorção, os ácidos fenólicos são conjugados por reações de metilação, sulfatação e glicuronidação, que são controladas por enzimas específicas que catalisam essas etapas, sendo que as reações de conjugação variam de acordo com a natureza do ácido fenólico e a quantidade ingerida (Heleno *et al.*, 2015).

Vários fatores alteram a biodisponibilidade dos ácidos fenólicos presentes nos alimentos, tais como a complexidade da matriz alimentícia, a forma química do composto, o tempo de trânsito intestinal, esvaziamento gástrico, metabolismo do composto e grau de conjugação, possíveis interações com proteínas na circulação sanguínea e tecidos, composição da microbiota intestinal e o perfil genético do indivíduo (Crozier *et al.*, 2009; Oliveira & Bastos, 2011)

A metodologia de análise utilizada para determinar as formas livre e ligada dos ácidos fenólicos consiste geralmente na extração com solventes orgânicos aquosos para se obter fenólicos solúveis, seguido de um tratamento de hidrólise para se obter compostos fenólicos ligados. Geralmente, a hidrólise assistida por ultrassom associada à hidrólise ácida tem sido utilizada para lixiviar e hidrolisar os compostos fenólicos mais rapidamente do que os métodos tradicionais, uma vez que a área de contato superficial entre as fases sólida e líquida é aumentada por ruptura de partículas (Herrera & Luque de Castro, 2004).

Na separação, identificação e quantificação dos compostos fenólicos são utilizadas técnicas avançadas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*- HPLC). A HPLC é uma técnica que auxilia os mais variados estudos, pois separa compostos presentes em uma matriz, os quais podem ser comparados aos padrões para sua identificação e quantificação. A técnica HPLC é mais comumente utilizada acoplada aos detectores como arranjo de diodos (DAD) e espectrômetro de massas (MS).

A principal classe de compostos fenólicos identificados na semente de chia, utilizando análise por cromatografia líquida de alta eficiência, foram os ácidos fenólicos, os

quais podem ser divididos em dois grupos principais, os ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, que são sintetizados a partir da via do ácido chiquímico (D'Archivio *et al.*, 2007; Oliveira & Bastos, 2011).

Martínez-Cruz *et al.* (2014) analisaram a semente de chia por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos (UHPLC-DAD), e os principais compostos quantificados foram o ácido rosmarínico (0,92 mg/g semente), ácido protocatecuico etil éster (0,74 mg/g semente), ácido caféico (0,02 mg/g semente), ácido gálico (0,01 mg/g semente) e daidzeína (0,006 mg/g semente).

Reyes-Caudillo *et al.* (2008) identificaram na semente de chia o ácido clorogênico (0,10 mg/g semente) e ácido caféico (0,06 mg/g semente), enquanto que nos extratos hidrolisados, foram identificados a quercetina (0,26 mg/g semente) e kaempferol (0,50 mg/g semente), por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de diodos (HPLC-DAD).

O ácido clorogênico, ácido caféico, quercetina, miricetina e kaempferol também foram identificados na farinha fibrosa e no óleo de chia (Capitani *et al.*, 2012; Ixtaina *et al.*, 2012). Os compostos fenólicos, principalmente os ácidos fenólicos e os flavonóides, têm sido amplamente estudados devido aos seus diversos benefícios para a saúde como antioxidantes, na prevenção de inflamações crônicas, doenças cardiovasculares e câncer.

4. Atividade antioxidante

Sementes oleaginosas são fontes de compostos fenólicos com elevada atividade antioxidante, sendo que esses compostos podem sequestrar radicais livres. Dentre os compostos fenólicos, estão os ácidos fenólicos, flavonóides, quinonas, cumarinas, lignanas, estilbenos, taninos, vitaminas, terpenóides, e alguns outros metabolitos endógenos (Cai *et al.*, 2004; Naczki & Shahidi, 2006).

Os antioxidantes fenólicos interferem no processo oxidativo como desativadores de radicais livres e também como queladores de metais. O potencial antioxidante dos compostos fenólicos depende do número e disposição dos grupos hidroxila na molécula (Cao *et al.*, 1997). Por isso, os fenólicos têm sido amplamente estudados, pois possuem bioatividades diversas que são benéficas para a saúde humana, reduzindo o risco de câncer, doenças cardíacas e diabetes; bem como exercendo atividades antibacterianas, antivirais, anti-inflamatórias e anti-alérgicas (Yao *et al.*, 2004; Oak *et al.*, 2005; Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

De acordo com Bianchi e Antunes (1999), os antioxidantes são aceptores de radicais livres, interceptando estes compostos gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, evitando a formação de lesões, a perda da integridade celular; e reconstituindo as membranas celulares já danificadas.

A atividade antioxidante nas sementes pode ser determinada por uma variedade de ensaios com diferentes mecanismos, incluindo a transferência de átomos de hidrogênio (HAT), transferência de elétrons (ET), poder de redução de metais e quelação de metais. O ensaio FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro) é um método que mede o poder de redução de metais, ou seja, mede a habilidade de antioxidantes em reduzir o complexo íon férrico (Fe^{3+}) ao complexo ferroso (Fe^{2+}) de coloração azul intensa em meio ácido (Benzie & Strain, 1996; Shahidi & Zhong, 2015).

O ensaio ORAC (Capacidade de Redução do Radical Oxigênio) é um método baseado na transferência de átomos de hidrogênio, e mede a habilidade de um antioxidante contra o radical peroxil, onde o antioxidante e um marcador fluorescente (fluoresceína) competem cineticamente por radicais peroxil, gerados através da decomposição de compostos nitrogenados, tais como AAPH (2,2'-azobis-(2-metilpropionamida)-dihidroclorado) a 37 °C (Ou *et al.*, 2013). O ORAC é um importante ensaio *in vitro* para avaliar a atividade antioxidante, pois o mesmo utiliza um radical livre biologicamente relevante (radical peroxil), o qual é prevalente na biologia humana. Este método considera tanto o tempo de inibição quanto o grau de inibição da liberação da ação do radical livre causada pelos antioxidantes (Ou *et al.*, 2013, Prior *et al.*, 2003; Prior, 2015).

Marineli *et al.* (2014) determinaram a atividade antioxidante da semente de chia, obtendo o valor de 514,30 $\mu\text{mol TE/g}$ para ensaio de ORAC, e valor de 405,71 $\mu\text{mol TE/g}$ para ensaio FRAP. Do mesmo modo, a atividade antioxidante da farinha fibrosa foi 577,2 $\mu\text{mol TE/g}$, sendo maior do que a encontrada em farelo de trigo (48,5 $\mu\text{mol TE/g}$), sorgo (51,7 $\mu\text{mol TE/g}$) e cevada (14,9 $\mu\text{mol TE/g}$), de acordo com Ragaei *et al.* (2006). Jiménez e colaboradores (2010) avaliaram a atividade antioxidante do óleo de chia e obtiveram o valor na faixa de 1,32 a 4,58 $\mu\text{mol TE/g}$.

Os ácidos fenólicos são a classe majoritária dos compostos fenólicos presentes na semente de chia, sendo que os mesmos comportam-se como antioxidantes devido à reatividade da sua fração fenólica, ou seja, a presença da hidroxila no anel aromático. Embora existam vários mecanismos, acredita-se que o modo predominante da atividade antioxidante dos ácidos fenólicos seja a desativação dos radicais via doação de átomos de hidrogênio (Shahidi & Ambigaipalan, 2015). Portanto, as sementes de chia são consideradas como

ingredientes funcionais com alto potencial antioxidante em produtos alimentícios com aplicações comerciais.

5. Atividade antitumoral

Atualmente, o câncer está entre as maiores causas de morte no mundo, e é definido como o conjunto de doenças nas quais as células anormais podem se dividir e crescer desordenadamente, sendo capazes de invadir outros tecidos, podendo se espalhar pelo corpo através do sistema circulatório estabelecendo-se em outros órgãos e tecidos (NCI, 2017).

Estudos relatam que o aumento na incidência de câncer pode estar relacionado à mudança nos hábitos alimentares, aumento da expectativa de vida, aumento dos poluentes e do contato com compostos carcinógenos, seja por esses fatores e outros, essa patologia é hoje um dos maiores problemas de saúde pública (Monteiro *et al.*, 2014; Siegel *et al.* 2016; Wang *et al.*, 2016).

Investigadores relatam que o estresse oxidativo é um dos componentes chave na ligação da toxicidade ambiental para o processo carcinogênico, pois as espécies reativas de oxigênio (ROS) são geradas em resposta à ambos os estímulos, endógenos e exógenos (Ziech *et al.*, 2010; Fuchs-Tarlovsky *et al.*, 2013). Evidências, tanto em estudos *in vivo* como *in vitro*, apontam agentes ambientais, tais como radiação, xenobióticos e compostos clorados, como indutores significativos de danos celulares via toxicidade mediada pela ROS (Klaunig & Kamendilus, 2004; Garis *et al.*, 2008; Fuchs-Tarlovsky *et al.*, 2013). Estudos descreveram a relação entre o aumento dos radicais celulares reativos de oxigênio e a patogênese de várias doenças crônicas, incluindo o câncer (Shobha & Andallu, 2013; Prasad *et al.*, 2016).

As ROS são constantemente geradas dentro do corpo e são necessárias para conduzir vias regulatórias, porém são também uma das causas de várias condições patológicas, incluindo o câncer. Numerosas linhas de evidência sugerem que as ROS podem promover, bem como suprimir a sobrevivência de células cancerígenas. As ROS são conhecidas por regular cada passo do desenvolvimento do tumor, incluindo transformação, sobrevivência, proliferação, invasão, metástase e angiogênese (Prasad *et al.*, 2016).

Estudos descrevem que as ROS podem mediar um ataque indireto ao DNA, principalmente por meio da reação com outros componentes celulares, tais como os fosfolipídios, resultando na geração de intermediários secundários reativos e acoplamento irreversível à base de DNA, formando adutos de DNA (Marnette, 2000; Fuchs-Tarlovsky *et al.*, 2013). A formação de adutos de DNA é central no processo de carcinogênese, pois se tais adutos escapam aos mecanismos de reparação celular e persistem, eles podem induzir ao erro,

e em última instância, à mutações (Wogan *et al.*, 2004). Portanto, lesões oxidativas têm sido implicadas na etiologia do câncer, e as lesões servem como biomarcadores críticos de danos oxidativos ao DNA (Valko *et al.*, 2004; Fuchs-Tarlovsky *et al.*, 2013).

Evidências em estudos experimentais demonstraram que os compostos naturais, entre eles, o compostos fenólicos, agem como reguladores positivos anticâncer, através do ajuste da resposta ao estresse oxidativo, inibindo a proliferação de células cancerígenas e modulando a sinalização autofágica (Hasima & Ozpolat, 2014; Lang *et al.*, 2015; Irimie *et al.*, 2015; Guaman-Ortiz *et al.*, 2017).

Estudos de modelos pré-clínicos e clínicos indicaram que os antioxidantes naturais promovem redução do risco de câncer, e dados epidemiológicos sugerem que pessoas que consomem dietas rica em antioxidantes naturais, provenientes de frutas e vegetais, têm um menor risco de desenvolver doenças crônicas e mortalidade do que aquelas que ingerem baixas quantidades de frutas e vegetais (Shanmugam *et al.*, 2016; Prasad *et al.*, 2016; Prasad *et al.*, 2017).

Estudo *in vivo* com dieta alimentar contendo cereais e vegetais, tais como o “Wushen” (mistura de alimentos contendo 55 ingredientes naturais, incluindo plantas, carnes, cereais e legumes), demonstraram elevada atividade antitumoral, reduzindo 48,52 % o crescimento tumoral em um modelo experimental com camundongos implantados subcutaneamente com células S180 de sarcoma murino, sendo que esse potencial antitumoral da dieta com “Wushen” está diretamente associada com suas propriedades antioxidantes (Wang *et al.*, 2014).

A ingestão de dietas contendo ervas, frutas e legumes aumenta significativamente a capacidade antioxidante do plasma, pois os compostos bioativos presentes nos vegetais são antioxidantes, e impedem a formação de radicais, removendo os radicais antes que os danos possam ocorrer, reparando os danos oxidativos, eliminando moléculas danificadas e impedindo mutações (Shobha & Andallu, 2013).

Os compostos fenólicos podem limitar a formação de células tumorais iniciadas, estimulando o reparo do DNA (Yang *et al.*, 2001). A quercetina, catequinas, isoflavonas, lignanas, flavanonas, ácido elágico e resveratrol induzem uma redução no crescimento do tumor (Shobha & Andallu, 2013). Os ácidos fenólicos, tais como ácido gálico, ácido clorogênico, ácido caféico possuem propriedades inibitórias contra os comportamentos invasivos (adesão, migração e angiogênese) e metastáticos de uma variedade de células de câncer *in vitro* e *in vivo* (Weng & Yen, 2012; Roleira *et al.*, 2015).

Estudos com ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) presentes nos óleos vegetais

e sementes oleaginosas vêm sendo investigados em ensaios tumorais devido à sua ação anti-inflamatória e anticarcinogênica. O elevado consumo de PUFA, especificamente, os ω 3-PUFA, pode contribuir para redução dos processos inflamatórios crônicos envolvidos no desenvolvimento de muitos tumores (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012). Além disso, os PUFA presentes nos óleos vegetais exercem efeitos antitumorais, afetando talvez a expressão gênica ou ativando moléculas de transdução de sinal envolvidas no controle do crescimento celular, diferenciação, apoptose, angiogênese e metástase (Espada *et al.*, 2007).

Miranda-Vilela *et al.* (2014) avaliaram os efeitos de uma suplementação com óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) sobre os danos oxidativos em camundongos com tumor sólido de Ehrlich tratados com o quimioterápico doxorrubicina, sendo observado efeito protetor aos danos oxidativos induzidos pela doxorrubicina e contenção do crescimento tumoral devido à elevada concentração dos PUFA no óleo de pequi.

Dentre os modelos de estudos *in vivo* para avaliar a atividade anticâncer, o tumor de Ehrlich tem sido utilizado por se tratar de um modelo de tumor murino prático e transponível para a análise dos efeitos antiproliferativos de diversos compostos, sendo que esse tumor pode se desenvolver na forma sólida, quando inoculado subcutaneamente, e na forma ascítica, quando as células são inoculadas no peritônio do animal (Nascimento *et al.*, 2006; Vendramini-Costa, 2010).

Espada *et al.* (2007) investigaram os efeitos antitumorais das dietas contendo 6 % de óleo de chia e 6 % de óleo de cártamo, consumidas no período de 45 dias, em um modelo de adenocarcinoma mamário murino transplantando subcutaneamente em camundongos Balb/C, obtendo redução significativamente de 29,68 % na massa tumoral e 88,89 % no número de metástases no grupos que consumiram a dieta com óleo de chia, porém a dieta com óleo de cártamo não reduziu significativamente a massa tumoral. Os resultados apontam que o óleo de chia, com elevado conteúdo de ω 3-PUFA, é um potencial agente antitumoral, podendo apresentar ação preventiva. Portanto, estudos efetuando a ingestão da semente e óleo de chia devem ser realizados a fim de comprovar o seu potencial preventivo e seu mecanismo de ação.

6. Referências

- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *F. Chemistry*, 152, 46–55.
- Álvarez-Chávez, L. M., Valdivia-López, M. L. A., Aburto-Juárez, M. L., & Tecante, A. (2008). Chemical characterization of the lipid fraction of mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.). *Int. J. of F. Properties*, 11(3), 687–697.
- Anderson, J. W., Baird, P., Davis, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., & Koraym, A. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nut. Reviews*, 67(4), 188–205.
- Ayerza, R. (1995). Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.) from five northwestern locations in Argentina. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72, 1079–1081.
- Ayerza, R. (2013). Seed composition of two chia (*Salvia hispanica* L.) genotypes which differ in seed color. *Emir. J. Food Agric.*, 25(7), 495–500.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2004). Protein and oil content, peroxide index and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.) grown in six tropical and sub-tropical ecosystems of South America. *Trop. Sci.*, 44(3), 131–135.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2007). Effect of dietary α -linolenic fatty acid derived from chia when fed as ground seed, whole seed and oil on lipid content and fatty acid composition of rat plasma. *An. of Nut. Metabolism*, 51, 27–34.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2009). Influence of environment on growing period and yield, protein, oil and α -linolenic content of three chia (*Salvia hispanica* L.) selections. *Ind. Cr. and Products*, 30, 321–324.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2011). Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Ind. Cr. and Products*, 34, 1366–1371.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochemistry*, 239(1), 70–76.
- Bianchi, M. L. P., & Antunes, L. M. G. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. de Nutrição*, 12(2), 123–130.
- Bodoira, R. M., Penci, M. C., Ribotta, P. D., & Martínez, M. L. (2017). Chia (*Salvia hispanica* L.) oil stability: study of the effect of natural antioxidants. *F. Sci. and Technology*, 75, 107–113.
- Busilacchi, H., Quiroga, M., Bueno, M., Di Sapio, O., Flores, V., & Severin, C. (2013). Evaluation of *Salvia hispanica* L. cultivated in the south of Santa Fe (Argentina). *Cult. Tropicales*, 34(4), 55–59.
- Cahill, J. P. (2003). Ethnobotany of chia, *Salvia hispanica* L. (*Lamiaceae*). *Econ. Botany*, 57, 604–618.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Lif. Sciences*, 74, 2157–2184.
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Fr. Rad. Biol. and Medicine*, 22, 749–760.
- Capitani, M. I., Spotorno, V., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2012). Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *F. Sci. and Technol.*, 45, 94–102.
- Ciftci, O. N., Przybylski, R., & Rudzinska, M. (2012). Lipid components of flax, perilla, and chia seeds. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 114, 794–800.
- Clifford, M. N., & Scalbert, A. (2000). Ellagitannins-occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *J. of the Sci. of F. and Agriculture*, 80, 1118–1125.

- Coates, W., & Ayerza, R. (1996). Production potential of chia in northwestern Argentina. *Ind. Cr. and Products*, 5, 229–233.
- Codex Alimentarius. (2003). World Health Organization Codex Alimentarius Commission Joint WHO/FAO, Codex Stan 33 – Codex standard for olive oils and olive pomace oils. *Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Geneve: WHO/FAO* (1981, Rev. 2-2003), 1–9.
- Coelho, M. S., & Salas-Mellado, M. M. (2014). Revisão: Composição química, propriedades funcionais e aplicações tecnológicas da semente de chia (*Salvia hispanica* L) em alimentos. *Braz. J. F. Technol.*, 17(4), 259–268.
- Coorey, R., Tjoe, A., & Jayasena, V. (2014). Gelling properties of chia seed and flour. *J. of F. Science*, 79(5), 859–866.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Reports*, 26, 1001.
- D'Archivio, M., Filesì, C., Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, 43(4), 348–361.
- Espada, C. E., Berra, M. A., Martinez, M. J., Eynard, A. R., & Pasqualini, M. E. (2007). Effect of chia oil (*Salvia hispanica*) rich in ω -3 fatty acids on the eicosanoid release, apoptosis and T-lymphocyte tumor infiltration in a murine mammary gland adenocarcinoma. *Plast., Leuk. and essenc. fatty acids*, 77(1), 21–28.
- Esposito, F., Arlotti, G., Bonifati, A. M., Napolitano, A., Vitale, D., & Fogliano, V. (2005). Antioxidant activity and dietary fibre in durum wheat bran by-products. *F. Res. International*, 38, 1167–1173.
- Fuchs-Tarlovsky, V. (2013). Role of antioxidants in cancer therapy. *Nutrition*, 29, 15–21.
- Garis D, Skiada V, & A., B. (2008). Redox signaling and cancer: The role of “labile” iron. *Cancer Lett.*, 266, 21–29.
- Guamán-Ortiz, L. M., Orellana, M. I. R., & Ratovitski, E. A. (2017). Natural compounds as modulators of non-apoptotic cell death in cancer cells. *Cur. Genomics*, 18, 132–155.
- Guinazi, M., Milagres, R. C. R. M., Pinheiro-Sant'Ana, H. M., & Chaves, J. B. P. (2009). Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. *Quim. Nova*, 32(8), 2098–2103.
- Hasima, N., & Ozpolat, B. (2014). Regulation of autophagy by polyphenolic compounds as a potential therapeutic strategy for cancer. *Cell Death Dis.*, 5, e1509.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds, a review. *F. Chemistry*, 173, 501–513.
- Herrera, M. C., & Luque de Castro, M. D. (2004). Ultrasound-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries. *Anal. and Bioanal. Chemistry*, 379(7–8), 1106–1112.
- Irimie, A. I., Braicu, C., Zanoaga, O., Pileczki, V., Gherman, C., Berindan-Neagoe, I., & Campian, R. S. (2015). Epigallocatechin-3-gallate suppresses cell proliferation and promotes apoptosis and autophagy in oral cancer SSC-4 cells. *OncoTargets Ther.*, 8, 461–470.
- Ixtaina, V. Y., Julio, L. M., Wagner, J. R., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2015). Physicochemical characterization and stability of chia oil microencapsulated with sodium caseinate and lactose by spray-drying. *Pow. Technology*, 271, 26–34.
- Ixtaina, V. Y., Martínez, M. L., Spotorno, V., Mateo, C. M., Maestri, D. M., Diehl, B. W. K., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2011). Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *J. of F. Compos. and Analysis*, 24, 166–174.
- Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2008). Physical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Ind. Cr. and Products*, 28, 286–293.

- Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2012). Oxidative stability of chia (*Salvia hispanica* L.) seed oil: effect of antioxidants and storage conditions. *J. of the Amer. Oil Chemists' Society*, 89(6), 1077–1090.
- Ixtaina, V. Y., Vega, A., Nolasco, S. M., Tomás, M. C., Gimeno, M., Bárzana, E., & Tecante, A. (2010). Supercritical carbon dioxide extraction of oil from Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.): characterization and process optimization. *J. of Supercrit. Fluids*, 55, 192–199.
- Jiménez, F. E. G., Beltrán-Orozco, M. C., & Martínez, M. G. V. (2010). The antioxidant capacity and phenolic content of chia (*Salvia hispanica* L.). integral seed and oil. *Special Abstr. / J. of Biotechnology*, 150S, S315.
- Klaunig, J., & Kamendilus, L. M. (2004). The role of stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharm. Toxicol.*, 44, 239–267.
- Kozłowska, M., Gruczynska, E., Scibisz, I., & Rudzinska, M. (2016). Fatty acids and sterols composition, and antioxidant activity of oils extracted from plant seeds. *F. Chemistry*, 213, 450–456.
- Lang, F., Qin, Z., Li, F., Zhang, H., Fang, Z., & Hao, E. (2015). Apoptotic cell death induced by resveratrol is partially mediated by the autophagy pathway in human ovarian cancer cells. *PLoS One*, 10(6), e0129196.
- Lin, K.-Y., Daniel, J. R., & Whistler, R. L. (1994). Structure of chia seed polysaccharide exudate. *Carb. Polymers*, 23(1), 13–18.
- Marineli, R. S., Moraes, E. A., Lenquiste, S. A., Godoy, A. T., Eberlin, M. N., & Maróstica Jr., M. R. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *F. Sci. and Technol.*, 59, 1304–1310.
- Marnette, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21, 361–370.
- Martínez-Cruz, O., & Paredes-López, O. (2014). Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) by ultra high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1346, 43–48.
- Martínez, M. L., Marín, M. A., Faller, C. M. S., Revol, J., Pencic, M. C., & Ribotta, P. D. (2012). Chia (*Salvia hispanica* L.) oil extraction: study of processing parameters. *F. Sci. and Technol.*, 47, 78–82.
- Miettinen, T. A., & Gylling, H. (1999). Regulation of cholesterol metabolism by dietary plant sterols. *Curr. Opin. Lipidol.*, 10, 9–14.
- Miranda-Vilela, A. L., Grisolia, C. K., Longo, J. P. F., Peixoto, R. C. A., Almeida, M. C., Barbosa, L. C. P., Roll, M. M., Portilho, F. A., Estevanato, L. L. C., Bocca, A. L., Bão, S. N., & Lacava, Z. G. M. (2014). Oil rich in carotenoids instead of vitamins C and E as a better option to reduce doxorubicin-induced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice: hematological, toxicological and histopathological evaluations. *J. of Nutr. Biochemistry*, 25, 1161–1176.
- Mohd Ali, N., Yeap, S. K., Ho, W. Y., Beh, B. K., Tan, S. W., & Tan, S. G. (2012). The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. *J. of Biom. and Biotechnology*, 2012, 1–9.
- Monteiro, L. S., Bastos, K. X., Barbosa-Filho, J. M., Athayde-Filho, P. F., Diniz, M. F. F. M., & Sobral, M. V. (2014). Medicinal plants and other living organisms with antitumor potential against lung cancer. *Evid.-Based Compl. and Altern. Medicine*, ID 604152, 15.
- Morrison, I. M. (1980). Changes in the lignin and hemicellulose concentrations of ten varieties of temperate grasses with increasing maturity. *Grass Forage Sci.*, 35, 287–293.
- Muñoz, L. A., Cobos, A., Diaz, O., & Aguilera, J. M. (2012). Chia seeds: microstructure, mucilage extraction and hydration. *J. of F. Engineering*, 108(1), 216–224.

- Naczek, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J. of Pharm. and Biom. Analysis*, 41, 1523–1542.
- Nardini, M., & Ghiselli, A. (2004). Determination of free and bound phenolic acids in beer. *F. Chemistry*, 84(1), 137–143.
- Nascimento, F. R.; Cruz, G. V.; Pereira, P. V.; Maciel, M. C.; Silva, L. A.; Azevedo, A. P. S.; Barroqueiro, E. S. B. & Guerra, R. N. M. (2006). Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life Sci.* 78(22), 2650–2653.
- NCI. (2017). National Cancer Institute. Disponível em: <https://www.cancer.gov/>. [Acesso em 05 de maio de 2017]
- Oak, M. H., El Bedoui, J., & Schini-Kerth, V. B. (2005). Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. *J. of Nutritional Biochemistry*, 16, 1–8.
- Oliveira, D. M., & Bastos, D. H. M. (2011). Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Quim. Nova*, 34(6), 1051–1056.
- Ou, B., Chang, T., Huang, D., & Prior, R. L. (2013). Determination of total antioxidant capacity by oxygen radical 563 absorbance capacity (ORAC) using fluorescein as the fluorescence probe: first action 2012.23. *J. of 564 AOAC Intern.*, 96(6), 1372–1376.
- Peiretti, P. G., & Gai, F. (2009). Fatty acid and nutritive quality of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds and plant during growth. *Anim. Feed Sci. and Technol.*, 148 267–275.
- Pelletier, X., Belbraouet, S., Mirabel, D., Mordret, F., Perrin, J. L., Pages, X., & Debry, A. (1995). A diet moderately enriched in phytosterols lowers plasma cholesterol concentrations in normocholesterolemic humans. *Ann. Nutr. Metab.*, 39, 291–295.
- Phillips, K. M., Ruggio, D. M., Toivo, J. I., Swank, M. A., & Simpkins, A. H. (2002). Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. *J. of F. Compos. and Analysis*, 15, 123–142.
- Poudyal, H., Panchal, S. K., Waanders, J., Ward, L., & Brown, L. (2012). Lipid redistribution by alpha-linolenic acid-rich chia seed inhibits stearyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. *J. of Nutr. Biochemistry*, 23, 153–162.
- Prasad, S., Gupta, S. C., Pandey, M. K., Tyagi, A. K., & Deb, L. (2016). Oxidative stress and cancer: advances and challenges. *Oxid. Med. and Cel. Longevity*, 2016, ID 5010423.
- Prasad, S., Gupta, S. C., & Tyagi, A. K. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: role of antioxidative nutraceuticals. *Canc. Letters*, 387, 95–105.
- Prior, R. L. (2015). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): new horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J. of Funct. Foods*, 18, 797–810.
- Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., & Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. F. Chemistry*, 51, 3273–3279.
- Ragaei, S., Abdel-Aal, M. E.-S., & Noaman, M. (2006). Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *F. Chemistry*, 98, 32–38.
- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., & Valdivia-López, M. A. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *F. Chemistry*, 107, 656–663.
- Roleira, F. M. F., Tavares-da-Silva, E. J., Varela, C. L., Costa, S. C., Silva, T., Garrido, J., & Borges, F. (2015). Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties. *F. Chemistry*, 183, 235–258.
- Rupollo, G., Gutkoski, L. C., Martins, I. R., & Elias, M. C. (2006). Efeito da umidade e do período de armazenamento hermético na contaminação natural por fungos e a produção de micotoxinas em grãos de aveia. *Ciênc. Agrotec.*, 30(1), 118–125.

- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. of Nutrition*, 130, 2073S–2085S.
- Segura-Campos, M. R., Salazar-Vega, M. I., Chel-Guerrero, L. A., & Betancur-Ancona, D. A. (2013). Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. *F. Sci. and Technology*, 50(2), 723–731.
- Silva, B. P., Anunciação, P. C., Matyelka, J. C. S., Lucia, C. M. D., Martino, H. S. D., & Pinheiro-Sant’Ana, H. M. (2017). Chemical composition of Brazilian chia seeds grown in different places. *F. Chemistry*, 221, 1709–1716.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects – a review. *J. of Funct. Foods*, Volume 18(Part B), 820–897.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *J. of Funct. Foods*, 18, 757–781.
- Shanmugam, M. K., Lee, J. H., Chai, E. Z. P., Kanchi, M. M., Kar, S., Arfuso, F., Dharmarajan, A., Kumar, A. P., Ramar, P. S., Looi, C. Y., Mustafa, M. R., Tergaonkar, V., Bishayee, A., Ahn, K. S. & Sethi, G. (2016). Cancer prevention and therapy through the modulation of transcription factors by bioactive natural compounds. *Semin. in Can. Biology*, 40–41, 35–47.
- Shobha, R. I., & Andallu, B. (2013). Oxidative stress and cancer: role of anti-carcinogenic herbs and spices. *Amer. J. of Phyt. and Clin. Therapeutics*, 3, 351–369.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 66 (1), 7–30.
- Tosco, G. (2004). Os Benefícios da “Chia” em Humanos e Animais. *Atual. Ornitológicas*, 119, 7.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Christopher, J., Rhodes, C., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell Bioch.*, 266, 37–56.
- Vendramini-Costa, D. B., & Carvalho, J. E. (2012). Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Cur. Pharmac. Design*, 18, 3831–3852.
- Vendramini-Costa, D. B., Castro, I. B. D., Ruiz, A. L. T. G., Marquissolo, C., Pilli, R. A., & Carvalho, J. E. (2010). Effect of goniotalamin on the development of Ehrlich solid tumor in mice. *Bio. & Medic. Chemistry*, 18, 6742–6747.
- Wang, C., Peng, R., Wang, L., Chen, P., Wang, S., Xu, X., Zhang, Q., Lin, S., & Hu, X. (2014). *Wushen*, a food mixture containing 55 different natural ingredients, inhibits S180 tumor growth *in vivo*. *Food Funct.*, 5, 1475–1480.
- Wang H, Yin Y, Wang P, Xiong C, Huang L, Li S, Li X, & L., F. (2016). Current situation and future usage of anticancer drug databases. *Apoptosis*, 21(7), 778–794.
- Weickert, M. O., & Pfeiffer, F. H. A. (2008). Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. *J. of Nutrition*, 138(3), 439–442.
- Weng, C.-J., & Yen, G.-C. (2012). Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Can. Treat. Reviews*, 38, 76–87.
- Willem van der Kamp, J., Jones, J., McCleary, B., & Topping, D. (2010). Dietary fibre: new frontiers for food and health. *Wageningen Acad. Publishers*.
- Wilson, J. R., Deinum, B., & Engels, F. M. (1991). Temperature effects on anatomy and digestibility of leaf and stem of tropical and temperate forage species. *Neth. J. Agric. Sci.*, 39, 31–48.
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, & LA., L. (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.*, 14, 437–486.
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T., & Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.*, 21, 381–406.

- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant F. for Hum. Nutrition*, 59, 113–122.
- Ziech, D., Franco, R., Georgkalikas, A. G., Georgakila, S., Malamou-Mitsi, V., Schoneveld, O., Pappa, A., & Panayiotidis, M. I. (2010). The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chem Biol Interact*, 188, 334–339.

CAPÍTULO II

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DA SEMENTE, FARINHA FIBROSA E ÓLEO DE CHIA (*Salvia hispanica* L.) POR LC-DAD-ESI-MS/MS

CAPÍTULO II

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DA SEMENTE, FARINHA FIBROSA E ÓLEO DE CHIA (*Salvia hispanica* L.) POR LC-DAD-ESI-MS/MS

Sheila Cristina de Oliveira Alves¹, Débora Barbosa Vendramini-Costa, Juliana Azevedo Lima Pallone¹, Eduardo A. Orlando¹, Daniel Barrera Arellano², Renato Grimaldi², Marcella A. Stahl², Alaíde Freitas Capelazzo², Mário Roberto Maróstica Júnior³, Cinthia Baú Betim Cazarin³, João Pedro Borges Ferreira⁴, Andreia B. Silva⁵, Maria do Rosario Bronze^{4,5,6}, Marcelo Alexandre Prado¹

¹*Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brasil.*

²*Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brasil.*

³*Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brasil.*

⁴*Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Av. Prof. Gama Pinto, 1649-00, Lisboa, Portugal.*

⁵*Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (IBET), Av. República, 2781-901, Oeiras, Portugal.*

⁶*Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB), Av. República, 2781-901, Oeiras, Portugal.*

* Autor para correspondência: sheilacris@yahoo.com.br

Colaborador: mpradofea@gmail.com

Parte do manuscrito publicado no periódico *Food Chemistry*.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.002>

RESUMO

O consumo dos produtos de chia, principalmente as sementes, tem recentemente aumentado e sugere-se que a inclusão deste alimento funcional na dieta humana diária poderia contribuir na melhoria da saúde dos consumidores. No entanto, um melhor conhecimento sobre a composição desses produtos é obrigatória, e entre os componentes químicos, os compostos fenólicos são importantes. Neste estudo a caracterização química e os principais compostos fenólicos presentes nas amostras comerciais de semente, farinha fibrosa e óleo de chia foram estudados. A metodologia assistida por ultrassom foi utilizada como procedimento de extração dos compostos fenólicos, e a cromatografia líquida de alto desempenho acoplada ao detector de espectrometria de massa foi aplicada para fins de identificação. Foram preparados extratos de metanol:água (80:20, v/v), os quais foram submetidos à uma hidrólise ácida. Os extratos brutos e hidrolisados da semente, farinha fibrosa e óleo de chia foram analisados, e os principais compostos fenólicos identificados foram o ácido caféico e o dansenshu, e os derivados do danshensu, tais como o ácido rosmarínico e o ácido salvianólico. O teor de fenólicos totais foi maior no extrato hidrolisado da semente, ($2,23 \pm 0,02$ mg GAE g⁻¹) do que no extrato bruto da semente ($1,16 \pm 0,01$ mg GAE g⁻¹). A atividade antioxidante da semente de chia foi determinada pelo ensaio de FRAP e ORAC nos extratos hidrolisados ($85,42 \pm 3,89$; $143,61 \pm 3,93$ μmol TE/g) e nos extratos brutos ($74,08 \pm 5,81$; $131,46 \pm 4,49$ umol TE/g), e os resultados foram significativamente diferentes. O extrato hidrolisado da semente de chia apresentou maior atividade antioxidante, sendo que esses resultados podem ser explicados pelas diferenças observadas no perfil cromatográfico obtido usando a detecção eletroquímica. Os resultados deste estudo fornecem novas informações sobre os principais ácidos fenólicos presentes na semente de chia, as quais são importantes fontes de antioxidantes naturais para a prevenção de doenças causadas pelo estresse oxidativo.

Palavras-chave: Capacidade antioxidante; ácidos hidroxicinâmicos; LC-DAD-ESI-MS/MS; atividade eletroquímica.

ABSTRACT

The consumption of chia products, namely seeds, has increased recently and it has been suggested that the inclusion of this functional food in a daily human diet could contribute to improve consumers' health. However, a better knowledge about the composition of these products is mandatory and among chemical components, phenolic compounds are important. In this work, the chemical characterization and the main phenolic compounds present in the commercial samples of seed, fiber flour and chia oil were studied. The ultrasound-assisted methodology was used as extraction procedure of the phenolic compounds and high-performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometer detector was applied for identification purposes. Methanol:water (80:20, v/v) extracts were prepared and submitted to an acidic hydrolysis. Crude and hydrolysates extracts of the seeds, fiber flour and oil were analyzed, and phenolic compounds found were mainly caffeic acid and danshensu, and danshensu derivatives, such as rosmarinic and salvianolic acids. The total phenolic content was higher in the hydrolyzed extract of the chia seed (2.23 ± 0.02 mg GAE g⁻¹) than (1.16 ± 0.01 mg GAE g⁻¹) in the crude extract of chia seed. The antioxidant activity of chia seed was measured by FRAP and ORAC assays in hydrolyzed extracts (85.42 ± 3.89 ; 143.61 ± 3.93 μmol TE/g) and crude extracts (74.08 ± 5.81 ; 131.46 ± 4.49 μmol TE/g), and results were significantly different. The hydrolyzed extract of the chia seed presented higher antioxidant activity, and these results can be explained by the differences observed in the chromatographic profile obtained using electrochemical detection. These results supply new information about the main phenolic acids presents in chia seed, which are important dietary sources of natural antioxidants for prevention of diseases caused by oxidative stress.

Keywords: Antioxidant capacity; hydroxycinnamic acids; LC-DAD-ESI-MS/MS; electrochemical activity.

1. INTRODUÇÃO

A *Salvia hispanica* L. é uma planta herbácea anual que pertence à família *Lamiaceae*, nativa do sul do México e norte da Guatemala. Atualmente a chia tem sido cultivada para fins comerciais na Argentina, Colômbia, Equador, Peru, Bolívia, Paraguai e Austrália (Coates & Ayerza, 1996; Busilacchi *et al.*, 2013).

Diferentes partes desta planta, principalmente as sementes, estão comercialmente disponíveis para consumo humano no mercado mundial como suplemento alimentar. As sementes de chia são geralmente consumidas trituradas ou na forma de grãos inteiros, em sucos de frutas, leite, bebidas refrescantes e saladas. A farinha fibrosa de chia, a qual é resíduo da extração do óleo, tem sido consumida como ingrediente em produtos de panificação e em indústrias de bebidas devido às suas propriedades funcionais, que incluem principalmente a aderência à gordura e formação de gel (Coorey *et al.*, 2014).

O crescente interesse no estudo da semente de chia tem ocorrido devido aos seus benefícios nutricionais e propriedades funcionais, os quais têm sido reconhecidos em alguns de seus componentes, entre eles, o seu elevado teor lipídico (21,4 a 32,6 g/ 100 g), sendo que o seu óleo contém ácidos graxos poli-insaturados, principalmente ácido α -linolênico (59,9 a 63,2 g/100 g) e baixa porcentagem de ácidos graxos saturados (Ayerza & Coates, 2009; Porras-Loaiza *et al.*, 2014). Além do alto conteúdo de minerais, fibra alimentar, proteínas e outros componentes bioativos, tais como tocoferóis e compostos fenólicos (Ayerza & Coates, 2011; Capitani *et al.*, 2012; Ayerza, 2013; Marineli *et al.*, 2014; Porras-Loaiza *et al.*, 2014).

Estudos recentes relatam que a ingestão diária dos componentes bioativos, entre eles, os compostos fenólicos presentes nas sementes de chia, apresentam efeitos na redução de doenças cardiovasculares (Ayerza & Coates, 2007; Croft, 2016), efeito hepatoprotetor (Poudyal *et al.*, 2012), controle da diabetes (Ho *et al.*, 2013) e efeito protetor contra o estresse oxidativo do plasma e de doenças relacionadas à obesidade (Marineli *et al.*, 2015). Entre os compostos fenólicos já identificados nos produtos de chia estão os ácidos fenólicos, principalmente o ácido caféico e ácido rosmarínico (Reyes-Caudillo *et al.*, 2008, Capitani *et al.*, 2012; Martínez-Cruz *et al.*, 2014), os quais possuem um importante papel na prevenção e no tratamento de diferentes desordens neurológicas, tais como a epilepsia (Coelho *et al.*, 2015).

O ácido caféico é conhecido por apresentar várias propriedades, tais como efeito hipoglicemiante (Chang *et al.*, 2015), antiprurítico (Pradhananga *et al.*, 2015), anticancerígeno (Nasr Bouzaiane *et al.*, 2015) e hepatoprotetor (Yang *et al.*, 2013). O ácido rosmarínico tem sido reportado como composto fenólico majoritário em espécies de *Salvia*

(Kamatou *et al.*, 2005, Cvetkovikj *et al.*, 2013, Trivellini *et al.*, 2016). Estudos têm relatado diversas funções imunorreguladoras do ácido rosmarínico, incluindo atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória (Jayanthi & Subramanian, 2014; Boonyarikpunchai *et al.*, 2014), inibição do processo inflamatório associado à reperfusão da isquemia hepática (Rocha *et al.*, 2015), efeito antidiabético (Jayanthi & Subramanian, 2014) e efeito protetor da memória (Fonteles *et al.*, 2016).

Yang *et al.* (2013) demonstraram que o ácido caféico e o ácido rosmarínico quando presentes em conjunto, apresentaram um aumento do efeito hepatoprotetor, aumento das enzimas endógenas antioxidantes e da glutathione reduzida (GSH), e diminuição da peroxidação lipídica no fígado.

Outros ácidos fenólicos têm sido caracterizados nas sementes de chia, entre eles, o ácido clorogênico (Reyes-Caudillo *et al.*, 2008) e ácido protocatecuico (Martínez-Cruz *et al.*, 2014), bem como alguns flavonóides, como a quercetina e kaempferol (Reyes-Caudillo *et al.*, 2008; Capitani *et al.*, 2012). O ácido caféico e ácido clorogênico também foram detectados no óleo de chia, assim como a miricetina, quercetina e kaempferol (Ixtaina *et al.*, 2011).

Estudos prévios sobre a caracterização de sementes de chia utilizaram solventes aquosos e orgânicos para a extração de compostos durante a etapa de preparação da amostra (Martínez-Cruz *et al.*, 2014). O método assistido por ultrassom associado à hidrólise ácida também tem sido utilizado para lixiviar e hidrolisar os compostos fenólicos mais rapidamente do que os métodos tradicionais, uma vez que a área de contato superficial entre as fases sólida e líquida é aumentada por ruptura de partículas (Herrera & Luque de Castro, 2004; Acosta-Estrada *et al.*, 2014).

No presente trabalho, utilizou-se a metodologia de extração por ultrassom (USE) para extração dos compostos fenólicos da semente, farinha fibrosa e do óleo de chia. O procedimento de hidrólise ácida foi também realizado nos extratos. A caracterização foi realizada por cromatografia líquida, utilizando diferentes modos de detecção, e os resultados foram comparados entre as diferentes frações de chia analisadas, utilizando dados de perfis cromatográficos, conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes e padrões

Os reagentes para caracterização físico-química e química foram o ácido clorídrico e metanol adquiridos da Chemco (Campinas, SP, Brasil); ácido sulfúrico concentrado, hidróxido de sódio da Dinâmica (Diadema, SP, Brasil); ácido bórico, carbonato

de sódio e clorofórmio, acetona, éter de petróleo da Synth (Diadema, SP, Brasil); sulfato de potássio anidro, sulfato de cobre II, sulfato de sódio anidro da Êxodo Científica (Hortolândia, SP, Brasil). O ácido fórmico (HCOOH, 98% PA) foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Acetonitrila (CH₃CN, 99,9% LC-MS) e metanol (MeOH, 99,8% LC-MS) foram adquiridos da Fisher Scientific (Waltham, EUA) para análise cromatográfica. A água ultra-pura (18,2 MΩ.cm) foi obtida da Millipore-Direct Q3 UV system (Millipore, USA).

Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), AAPH (2,2'-azobis(2-metil-propionamida)dicloridrato), TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina), ácido-2-tiobarbitúrico, ácido gálico foram todos obtidos da Sigma-Aldrich (Sigma Co., St. Louis, MO, USA). O reagente Folin-Ciocalteu's foi obtido da Dinâmica (Diadema, SP, Brasil). O sal de fluoresceína sódica foi proveniente da Vetec Química (São Paulo, SP, Brasil). O hexano grau HPLC (Macron, EUA), isopropanol grau HPLC (J.T. Baker, EUA), ácido acético grau HPLC (J.T. Baker, EUA) e os padrões de tocoferóis – α , β , γ e δ (Merck, Darmstadt, Alemanha) e ésteres metílicos do C₄ ao C₂₄ (FAME Mix, Supelco, EUA).

Foram utilizados ácido nítrico e peróxido de hidrogênio de grau analítico da Synth (Diadema, SP). Os padrões utilizados ferro (Fe), magnésio (Mg), zinco (Zn), potássio (K), cobre (Cu), cálcio (Ca) e manganês (Mn), na concentração de 1,000 mg/g, foram obtidos de Quimis (Diadema, SP, Brasil).

2.2 Matérias-primas

A semente, farinha fibrosa (fiber flour powder-435) e óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) provenientes da PFD Benexia S.A. (Santa Cruz, Bolívia) foram obtidos da R&S Blumus Comercial de Produtos Alimentícios Ltda (Campinas, SP, Brasil). De acordo com a informação do produtor (FPT S.A Santiago, Chile), o óleo de chia foi obtido a partir da semente de chia após um processo de prensagem a frio, e o seu material residual foi triturado até o tamanho de 435 μ m para obtenção da farinha fibrosa (fiber flour powder-435). O óleo foi armazenado entre 2 a 8 °C em garrafas de vidro âmbar sem espaço de ar. As matérias-primas utilizadas foram armazenadas em freezer (-20 °C $\pm$ 2 °C). As sementes de chia foram trituradas em moinho (modelo A11 basic BS32, marca IKA Mill, São Paulo, Brasil) antes da realização de cada análise.

2.3 Composição centesimal

A composição centesimal da semente e farinha fibrosa de chia foi determinada quanto ao teor de umidade, cinzas, proteínas (AOAC, 2006) e lipídeos (Bligh & Dyer, 1959).

O teor de carboidratos foi determinado por diferença, conforme a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 360 (BRASIL, 2003). O conteúdo de fibra alimentar solúvel e fibra alimentar insolúvel foi determinado de acordo com o método enzimático-gravimétrico (AOAC, 2006) e o conteúdo de fibra alimentar total foi calculado a partir da soma dos valores de fibra alimentar solúvel e fibra alimentar insolúvel. O valor de energia foi determinado utilizando-se o fator de Atwater (Atwater & Bryant, 1900).

2.4 Minerais

Pesou-se cerca de 0,6000 g de cada amostra em tubo de digestão para cada mineral a ser analisado, em balança analítica (modelo AY220, Shimadzu), adicionou-se cerca de 4 mL de ácido nítrico. Para cada mineral a ser determinado nas amostras, as análises foram realizadas em triplicata. Os tubos foram tampados e ficaram em processo de digestão a frio por 12 horas (*overnight*). Foram preparados três tubos “branco” (sem as amostras). Logo após o período de *overnight*, as tampas foram retiradas dos tubos, adicionou-se 2 mL de ácido nítrico e 2 mL de peróxido de hidrogênio. Os tubos foram colocados no bloco digestor (modelo MA4025, Marconi) e pequenos funis foram colocados para cobrir cada tubo com objetivo de manter o refluxo do ácido nítrico no período de digestão a quente.

Inicialmente os tubos foram aquecidos por 30 minutos a uma temperatura de 50 °C no bloco digestor, decorrido este tempo, a temperatura foi aumentada para 100 °C, por mais 30 minutos e na sequência a 115 °C por mais 2 horas. Após a digestão, os tubos foram retirados do bloco e aguardou-se o resfriamento a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Após o resfriamento, adicionou-se 5 mL de água aos tubos de digestão. Posicionou-se os tubos no banho de ultrassom (modelo 1510, Branson) por 5 minutos. Transferiu-se o conteúdo dos tubos para balões volumétricos de 25 mL e completou-se o volume com água deionizada. As amostras foram filtradas em papel de filtro e armazenadas em frasco de plástico para determinação do teor de ferro (Fe), magnésio (Mg), zinco (Zn), potássio (K), cobre (Cu), cálcio (Ca) e manganês (Mn).

Os teores de Fe, Mg, Zn, K, Cu, Ca e Mn foram determinados por Espectrometria de Absorção Atômica com chama (Perkin Elmer modelo Analyst 200), onde as amostras foram introduzidas em um nebulizador e misturadas a uma chama de ar ($2,5 \text{ L.h}^{-1}$) e acetileno (10 L.h^{-1}) com temperatura de aproximadamente de 2000 °C. Uma lâmpada de deutério foi utilizada para correção da radiação de fundo e lâmpada de catodo oco (Perkin Elmer) para determinação de Fe (248,33 nm), Mg (285,21 nm), Zn (213,86 nm), Cu (324,75 nm), Ca (422,67 nm), Mn (279,48 nm) e K (emissão, slit padrão 1,5 mg/L) com metodologia validada

(Rebellato *et al.*, 2015). Foram construídas curvas de calibração para a obtenção de equações que correlacionam a absorvância medida com a concentração em $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ para cada mineral presente nas amostras (AMC, 1987; Soeiro *et al.*, 2010). As curvas consistiram de seis pontos e as concentrações utilizadas foram 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 1,5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para cada mineral. Os resultados das análises foram expressos em mg/kg .

2.5 Índice de peróxido

O índice de peróxido no óleo de chia foi determinado conforme o método Cd 8b-90 (AOCS, 2009), aplicável a todos os óleos. Pesou-se 5 g de óleo de chia em erlenmeyer, posteriormente foi adicionado 50 mL de solução de ácido acético:iso-octano (30:20, v/v) e agitou-se até a completa dissolução. Adicionou-se 0,5 mL da solução de iodeto de potássio saturada e agitou-se durante 1 minuto, em seguida foi adicionado 30 mL de água destilada e agitou por mais 1 minuto. Posteriormente, adicionaram-se 2,0 mL de lauril sulfato de sódio 10 % e 2,0 mL de amido indicador a 1 %. Titulou-se com solução de tiosulfato de sódio 0,01 M padronizada. O índice de peroxidação foi expresso em $\text{meq O}_2/\text{kg}$.

2.6 Índice de acidez

A análise dos ácidos graxos livres e a determinação do índice de acidez no óleo de chia foi realizada segundo a metodologia da Ca 5a-40 (AOCS, 2009). Pesou-se 28,2 g de óleo de chia em erlenmeyer e adicionou-se 100 mL de álcool etílico 95 %, em seguida aqueceu-se até 50 °C. Adicionou-se indicador fenolftaleína e titulou-se com solução de NaOH 0,1 M padronizada. Os resultados foram expressos em g ácido oléico/100 g de óleo.

2.7 Determinação de cor

A cor do óleo de chia foi determinada pelo método de Lovibond (AOCS, 2009) e o método colorimétrico CIELAB (Ixtaina *et al.*, 2012). A cor foi obtida pelo equipamento automático Lovibond PFX 995 Tintometer, usando cubeta de vidro óptico de 51/4", segundo o método Cc13j-97 (AOCS, 2009). Utilizando-se o espectrofotômetro de cor, modelo ColorQuest II (Hunter Lab), ângulo de visão 10°, iluminante D65, usando o 45 sistema de cor CIELAB L^*C^*h para transmitância total de cada amostra em cubeta de vidro opticamente limpo com 10 mm de caminho óptico, sendo a determinação baseada no sistema CIELAB (representação polar do sistema $L^* a^* b^*$). No sistema CIELAB, o L^* indica luminosidade, que varia de zero (preto) a 100 (branco); enquanto a^* e b^* representam as coordenadas de cromaticidade, sendo que $+a^*$ indica tendência para o vermelho e $-a^*$ tendência para o verde;

+b* indica tendência para o amarelo e -b* tendência para o azul. As medidas foram obtidas em triplicata.

2.8 Índice de iodo

O índice de iodo foi determinado no óleo de chia conforme o método Cd 1c-85 (AOCS, 2009), sendo calculado a partir da composição dos ácidos graxos obtidos por cromatografia gasosa.

2.9 Índice de saponificação

O índice de saponificação foi determinado no óleo de chia conforme o método AOCS Cd 3a-94 (AOCS, 2009), sendo calculado a partir da composição dos ácidos graxos obtidos por cromatografia gasosa.

2.10 Perfil dos ácidos graxos

A extração lipídica da semente e farinha fibrosa de chia foi realizada segundo método de Bligh & Dyer (1959), utilizando agitador de tubos (Labnet, modelo S0200). A composição dos ácidos graxos presentes na fração lipídica da semente, farinha fibrosa e óleo de chia foi determinada por cromatografia gasosa, após esterificação, utilizando a metodologia descrita por Hartmann & Lago (1973).

Os ésteres metílicos foram separados segundo o método AOCS Ce 2-66 (2009), analisados em cromatógrafo gasoso capilar (marca CGC Agilent, modelo 6850 Series GC System) com detector de ionização de chama. Os componentes foram separados em coluna capilar de sílica fundida DB-23 Agilent (50 % cianopropil metil polisiloxano modificado), com dimensões de 60 m, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 0,25 μ m. As condições de operação foram as seguintes: fluxo de 1,00 mL/min, temperatura programada do detector de 280 °C, temperatura do injetor a 250 °C, temperatura do forno (110 °C – 5 min; 110 – 215 °C – 5 min, 215 °C – 24 min), gás de arraste hélio; velocidade linear do gás de arraste de 24 cm/s, volume injetado de 1,0 μ L. A identificação e quantificação dos ácidos graxos foi realizada através da comparação do tempo de retenção dos ácidos graxos das amostras e dos padrões.

2.11 Tocoferóis

A separação, identificação e quantificação dos teores de α -, β -, γ - e δ -tocoferol foram efetuadas nas frações lipídicas da semente e farinha fibrosa, e no óleo de chia por

cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), conforme o método oficial Ce 8-89 (AOCS, 2009). Em um balão volumétrico, 0,10 g de óleo foi diluído em volume de hexano para completar 10 mL e filtrado em membrana PVDF de 0,22 μm (Millipore, USA). As injeções foram realizadas com um *loop* de 20 μL desta solução. As determinações foram conduzidas utilizando cromatógrafo (Perkin-, série 200) acoplado ao detector de fluorescência (Perkin Elmer, série 200A) em condição isocrática à temperatura ambiente (25 °C).

As separações foram conduzidas utilizando coluna analítica Hibar RT 250 x 4 mm Li Chrosorb Si 60 (5 mm), fluxo médio de 1,0 mL/min. A fase móvel de grau cromatográfico foi composta por hexano:isopropanol (99:1,v/v). A detecção foi realizada por fluorescência utilizando comprimento de onda de excitação igual a 290 nm e de emissão de 330 nm. A integração dos dados foi realizada através do Peak Simple Chromatography Software. A identificação foi baseada na comparação dos tempos de retenção com os de padrões validados sob as mesmas condições de operação.

A quantificação foi realizada por padronização externa, tendo sido construída a curva analítica com 5 níveis de concentração. Cada ponto foi representado pela média de 5 determinações. As concentrações das frações de α -, β -, γ -, e δ -tocoferol variaram na faixa de 1,4 a 10,8 $\mu\text{g/mL}$, 1,8 a 13,9 $\mu\text{g/mL}$, 2,2 a 17,5 $\mu\text{g/mL}$ e 2,0 e 17,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em mg/kg.

2.12 Carotenóides

O processo de extração dos carotenóides totais da semente e farinha fibrosa de chia baseou-se no procedimento descrito por Rodriguez-Amaya *et al.* (1976), com algumas modificações. Cerca de 10 g de amostra (semente triturada ou farinha fibrosa) foi macerada com acetona resfriada (50 mL) e hyflo-supercel (5 g), depois colocada em homogeneizador (TE-645, Tecnal) por três minutos. O processo de extração das amostras foi realizado em triplicata. O material foi filtrado a vácuo para um kitassato através de um funil de büchner com papel de filtro. As extrações com acetona foram repetidas até o resíduo do filtro se tornar o mais claro possível, ou seja, total remoção dos carotenóides.

O filtrado foi transferido vagarosamente para um funil de separação, contendo 50 mL de éter de petróleo resfriado, permitindo a partição dos carotenóides para o éter. A acetona foi retirada do funil através de três lavagens consecutivas com água destilada. Para a saponificação dos lipídios e clorofilas, adicionou-se solução metanólica de KOH (10 %) na proporção de 1:1 (v/v). A mistura permaneceu por uma noite em temperatura ambiente (25 $\pm$ 2 °C) e a fase etérea foi separada da metanólica em funil de separação contendo volume

adicional de éter de petróleo. A fase em éter de petróleo foi lavada com água destilada até a remoção completa do álcali (pH próximo da neutralidade). Sulfato de sódio anidro foi adicionado para remoção da água remanescente. O extrato foi então concentrado em evaporador rotativo (34 ± 2 °C) sob pressão reduzida (90 rpm). Em seguida, foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL, o volume foi corrigido com éter de petróleo e realizado a leitura no espectrofotômetro.

Para determinar o teor de carotenóides no óleo de chia, pesou-se aproximadamente 4 g do óleo de chia e diluiu-se em 4 mL de éter de petróleo. A mistura foi transferida através de um funil para um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi corrigido com éter de petróleo (Carvalho *et al.*, 2012) e seguido a leitura no espectrofotômetro. Durante toda a análise, os extratos foram protegidos da luminosidade, mantendo a vidraria com papel laminado e local escuro. O teor de carotenóides totais foi determinado no espectrofotômetro (Marca Pro-Análise, modelo UV1600, Brasil) em 450 nm e o resultado obtido pela equação [Teor de carotenóides totais = $(A \cdot V \cdot 10^4) / (A^1 \cdot P)$]: Onde A= absorbância do extrato; V = volume total do extrato (25 mL); A^1 = coeficiente de absorção do β -caroteno em éter de petróleo = 2592 e P= peso da amostra (g). O resultado foi expresso em β -caroteno equivalentes ($\mu\text{g/g}$).

2.13 Malondialdeído

A determinação dos teores de malondialdeído (MDA) na semente, farinha fibrosa e óleo de chia foram realizados conforme o método descrito por Sinnhuber & Yu (1958) em triplicata. Pesou-se 0,25 g de amostra, e adicionou-se na ordem em um balão de refluxo, 5 mL de reagente ácido-2-tiobarbitúrico (TBA), 5 mL de água miili-Q, 5 mL de HCL 0,6 N e 10 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 20 %. O balão foi conectado em um condensador (Allihn) em banho maria a 100 °C durante 30 minutos, após esse período, adicionou-se pelo topo do condensador 75 mL de HCL 0,6 N sob refluxo por mais 10 minutos. Após o término, os balões foram resfriados, a solução foi filtrada e centrifugada por 10 minutos a 1800 rpm. Os teores MDA foram quantificados a 535 nm usando um leitor de microplacas (SynergyHT, Biotek, Winooski, EUA). A curva padrão ($0,625 - 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ MDA) foi preparada usando padrão de MDA. A concentração de MDA é expressa em g MDA/kg.

2.14 Extração dos compostos fenólicos totais

2.14.1 Extrato bruto da semente e farinha de chia

Utilizou-se o método de extração por ultrassom (USE) para extração dos compostos fenólicos (Pizarro *et al.*, 2013), com adaptações. Aproximadamente 2 g de amostra (semente de chia triturada ou farinha fibrosa) foram homogeneizados com 10 mL de solução metanol:água (80:20, v/v). Após agitação em vórtex durante 10 s, as amostras foram colocadas imediatamente no banho de ultrassom (Modelo B12, Onic 12 Ultrasonics, Lisboa, Portugal). As extrações foram realizadas a 48 kHz de frequência e 55 W de potência, durante 60 min a 25 ± 2 °C. Depois, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm durante 30 min e o sobrenadante removido. O sobrenadante foi evaporado em rotaevaporador (IKA, RV10 control) até a secura na temperatura de $40 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sob pressão reduzida (335 mbar). O resíduo seco foi dissolvido em 2 mL de metanol:água (80:20, v/v), filtrado através de uma membrana de PVDF de 0,22 μm (Millipore, EUA), obtendo assim os extratos brutos da semente e farinha fibrosa, os quais foram armazenados a $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise. Todas as amostras foram extraídas em duplicata.

2.14.2 Extrato bruto do óleo de chia

O procedimento descrito em 2.14.1 foi utilizado com algumas modificações. Pesou-se aproximadamente 2 g de óleo de chia e em seguida foram adicionados 5 mL de hexano e 5 mL de solução de metanol:água (80:20, v/v). Após agitação em vórtex por aproximadamente 10 s, colocou-se o tubo imediatamente no banho de ultrassom (Modelo B12, Onic 12 Ultrasonics, Lisboa, Portugal). As extrações foram realizadas a 48 kHz de frequência e 55 W de potência, durante 60 min a 25 ± 2 °C. Esta mistura foi centrifugada a 4000 rpm durante 10 min e o extrato polar (fase inferior) foi removido. Os extratos polares foram evaporados no rotaevaporador (IKA, RV10 control) até a secura na temperatura de $40 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sob pressão reduzida (335 mbar). Após evaporação do solvente, o resíduo seco foi dissolvido em 2 mL de metanol:água (80:20, v/v) e filtrado através de uma membrana de PVDF de 0,22 μm (Millipore, EUA), obtendo assim os extratos brutos do óleo, os quais foram armazenados a $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise. Todas as amostras foram extraídas em duplicata.

2.14.3 Extrato hidrolisado da semente, farinha e óleo de chia

A hidrólise ácida dos extratos brutos da semente, farinha fibrosa e óleo foram realizadas de acordo com Tsimidou *et al.* (2014). Uma alíquota de 1 mL dos extratos metanólicos brutos das respectivas amostras foram misturados com 1 mL de solução 1 M de H_2SO_4 e mantidos vedados no banho de água a $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 hs. Cada extrato foi filtrado

através de uma membrana de PVDF de 0,22 μm (Millipore, EUA), obtendo assim os extratos hidrolisados, os quais foram armazenados a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise.

2.15 Condições cromatográficas para identificação dos compostos fenólicos

2.15.1 HPLC-DAD-ESI-MS/MS

Os compostos fenólicos contidos nos extratos brutos e hidrolisados da semente, farinha fibrosa e óleo de chia foram analisados no cromatógrafo (Waters® Alliance 2695, Irlanda) equipado com uma bomba quaternária, desgaseificador de solvente, injetor automático e forno de coluna, acoplado ao um detector de arranjos de diodos (Waters 2996 PDA, Irlanda) em Lisboa, Portugal. Utilizou-se uma pré-coluna (100RP-18, $5\mu\text{m}$) e uma coluna de fase reversa C18 (LiCrospher® 100 RP-18, $250 \times 4\text{mm}$; $5\mu\text{m}$) em um forno termostaticado a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a separação. Foi utilizado como fase móvel água milli-Q e ácido fórmico (99,5:0,5, v/v) como eluente A e acetonitrila como eluente B a um fluxo constante de 0,30 mL/min. Todos os solventes foram filtrados através de uma membrana de PVDF de 0,22 μm (Millipore, EUA) antes da análise.

O sistema foi executado com o seguinte programa de gradiente: 0-15 min de 99 a 90 % de A; 15-20 min de 90 a 89 % de A; 20-30 min a 89 % de A; 30-45 min de 89 a 85 % A; 45-55 min a 85 % A; 55-95 min de 85 a 70 % A; 95-100 min a 70 % A; finalmente voltando as condições iniciais. O volume de injeção foi de 20 μL . O detector de arranjos de diodos foi utilizado para analisar a absorção nos comprimentos de onda entre 210 a 600 nm. Utilizou-se um espectrômetro de massa triplo quadrupolo (MicroMass® Quattro micro, Waters, Irlanda) equipado com fonte de ionização por eletrospray (ESI) em temperatura de $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, voltagem do capilar de 3,0 kV e voltagem do cone de 20 kV. Os compostos foram ionizados em modo negativo e os espectros foram registrados no intervalo de relação massa/carga (m/z) entre 60-1500. As condições analíticas foram otimizadas para maximizar o sinal do íon precursor ($[\text{M}-\text{H}]^{-}$). Utilizou-se nitrogênio de alta pureza (N_2) tanto como gás de secagem como gás nebulizador. Utilizou-se Argônio de ultra-alta pureza (Ar) como gás de colisão. O software MassLynx versão 4.1 foi utilizado para aquisição e processamento dos dados.

2.15.2 HPLC-DAD-ED

Os compostos fenólicos contidos nos extratos brutos e hidrolisados da semente, farinha fibrosa e óleo de chia foram analisados em um ThermoFinnigan (modelo Surveyor, San Jose, CA, EUA) equipado com um injetor automático, bomba, detector de arranjos de

diodos (ThermoFinnigan Surveyor, San Jose, CA, EUA) e um detector eletroquímico (Dionex ED 40) em Oeiras, Portugal. A separação cromatográfica dos compostos foi realizada em uma coluna de Lichrocart RP-18 (250 x 4 mm, tamanho de partícula 5 μ m, Merck) e uma pré-coluna Manu-cart® RP-18 em um forno termostato a 35 °C. O detector de arranjos de diodos foi programado para uma varredura entre 192 a 798 nm a uma velocidade de 1 Hz com uma largura de banda de 5 nm. A detecção foi monitorada utilizando três canais individuais (280, 320 e 360 nm) a uma velocidade de 10 Hz com uma largura de banda de 11 nm. O volume de injeção aplicado foi de 20 μ L. A temperatura do injetor automático foi ajustada a 12 °C.

A fase móvel consistiu de acetonitrila:água:ácido fórmico (90:9,5:0,5, v/v/v) como eluente B e ácido fórmico aquoso (99,5:0,5, v/v) como eluente A, a um fluxo constante de 0,30 mL/min. Todos os solventes foram filtrados através de uma membrana de PVDF de 0,22 μ m (Millipore, EUA) antes da análise. O sistema foi executado com o seguinte programa de gradiente: 0-5 min a 98,89 % de A; 5-45 min a 98, 89-33,33 % de A; 45-90 min a 33,33 %-0 % de A; 90-100 min a 0 % de A; 100-110 min a 0-98,99 % de A; 105-120 min a 98,89 % de A; finalmente voltando as condições iniciais.

A detecção eletroquímica foi programada para uma variação linear de -1,0 V a 1,0 V em 1,00 s (detecção por voltametria integrada utilizando uma variação cíclica do potencial). As medições foram realizadas com uma frequência de 50 Hz com um conversor analógico/digital. Os sistemas de aquisição de dados foram o Chromquest versão 4.0 (ThermoFinnigan-Surveyor, San Jose, CA, EUA) para o detector de arranjos de diodos e o software 4880 (Unicam) para o detector eletroquímico.

2.16 Determinação do conteúdo de fenólicos totais

O conteúdo fenólico total da semente, farinha fibrosa e óleo de chia (extratos metanólicos brutos e hidrolisados) foi determinado de acordo com o método de Folin-Ciocalteau (Swain & Hillis, 1959). Resumidamente, foram misturados 50 μ L de extrato, 800 μ L de água destilada e 25 μ L (0,25 N) de reagente de Folin-Ciocalteau e incubados à temperatura ambiente durante 3 min. Em seguida, adicionou-se 100 μ L de solução de carbonato de sódio (1 N) e incubou-se ainda durante 2 hs a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) em ambiente escuro. A absorvância foi lida a 725 nm no leitor de microplacas (SynergyHT, Biotek, Winooski, EUA). O ácido gálico foi utilizado para quantificação e os resultados foram expressos em termos de equivalente de ácido gálico (mg GAE/g). Todas as medidas foram realizadas em triplicata para cada amostra analisada.

2.17 Deteminação da atividade antioxidante

2.17.1 Ensaio FRAP

A capacidade antioxidante das amostras estimadas pelo ensaio de FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro) foi realizada baseando-se na metodologia de Benzie & Strain (1996), com algumas modificações. Em condições escuras, o reagente FRAP foi preparado com tampão acetato 300 mmol/L (pH 3,6), 10 mmol 2,4,6-tris (2-piridil)-s-triazina (TPTZ) em uma solução de 40 mmol de HCl e 20 mmol FeCl₃. Em eppendorf foram adicionados 20 µL da amostra, 600 µL de reagente FRAP e 60 µL de água ultrapura e em seguida foram misturados e mantidos no banho-maria durante 30 min a 37 °C. Após resfriamento até a temperatura ambiente, todas as amostras foram lidas a 595 nm no leitor de microplacas (SynergyHT, Biotek, Winooski, EUA). Preparou-se também uma curva padrão Trolox (10-800 µmol TE). Os resultados foram expressos em µmol Trolox equivalente (TE)/g. Todas as medidas foram realizadas em triplicata para cada extrato analisado.

2.17.2 Ensaio ORAC

Os ensaios ORAC (Capacidade de Redução do Radical Oxigênio) foram baseados na capacidade fluorescente da fluoresceína sódica na presença de radicais de oxigênio, sendo realizado conforme o método descrito por Ou *et al.* (2013). O radical peroxil foi gerado pela solução de AAPH (2,2'-azobis (2-metilpropionamidina) dicloridrato) sendo preparada imediatamente antes da análise, e a fluoresceína foi utilizada como substrato. No escuro, foram adicionados 20 µL de amostra, 120 µL de fluoresceína em tampão fosfato (pH 7,4) e 60 µL de AAPH em microplacas pretas. O leitor de microplacas (SynergyHT, Biotek, Winooski, USA) foi ajustado (filtros fluorescentes, comprimento de onda de excitação, 485 nm, comprimento de onda de emissão, 520 nm) e Trolox foi utilizado como padrão (5-50 µmol). Os valores de ORAC foram expressos em µmol Trolox equivalente (TE)/g. Todas as medidas foram realizadas em triplicata para cada extrato analisado.

2.18 Análise dos resultados e análises estatísticas

A identificação dos compostos fenólicos, ou seja, dos espectros de massas obtidos neste estudo foram comparados com os espectros de massas já publicados em outros trabalhos científicos, juntamente com a ordem de eluição e comprimento de onda máximo de absorção no UV (λ_{max}). Para fins de comparação entre as amostras, por HPLC, a % da área de pico foi medida no cromatograma no comprimento de onda de 280 nm.

Os resultados da composição centesimal, caracterização físico-química e química, composição dos ácidos graxos e tocoferóis, conteúdo mineral, espectrofotométricos relativos à determinação dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. As análises foram baseadas no teste *t* ou one way ANOVA, seguido de teste de Tukey para comparações das médias, conforme o número de grupos. O limite de significância para ambos os testes foi estabelecido em $p < 0,05$ (5 % de significância). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (Software GraphPad, Inc. La Jolla, CA, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização físico-química e química

Atualmente no Brasil, as sementes de chia têm sido adicionadas nas refeições diárias, na forma de grãos inteiros ou trituradas em sucos de frutas, leite, bebidas refrescantes, saladas, sopas e em conjunto com cereais matinais. A investigação dos principais componentes presentes na semente de chia e nos seus produtos têm como objetivo principal avaliar suas propriedades nutricionais e seu potencial como fonte de compostos bioativos. A **Tabela 1** apresenta os resultados da composição da semente e farinha fibrosa de chia.

Tabela 1. Composição centesimal da semente e farinha fibrosa de chia (g/100 g) em base úmida.

Componentes	Chia*	
	Semente	Farinha Fibrosa
Umidade	4,55 $\pm$ 0,04 ^b	7,05 $\pm$ 0,05 ^a
Proteínas ^I	23,50 $\pm$ 0,54 ^b	32,50 $\pm$ 0,94 ^a
Lipídeos	30,56 $\pm$ 0,05 ^a	9,90 $\pm$ 0,13 ^b
Cinzas	4,55 $\pm$ 0,08 ^b	5,86 $\pm$ 0,04 ^a
Carboidratos ^{II}	36,84 $\pm$ 0,28 ^b	44,69 $\pm$ 0,32 ^a
Fibra alimentar total ^{III}	35,50 $\pm$ 0,60 ^b	40,90 $\pm$ 0,90 ^a
Fibra insolúvel	31,90 $\pm$ 0,49 ^b	36,38 $\pm$ 0,88 ^a
Fibra solúvel	3,60 $\pm$ 0,11 ^b	4,52 $\pm$ 0,01 ^a
Valor energético ^{IV}	516,40 $\pm$ 0,30 ^a	397,86 $\pm$ 0,47 ^b

* Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

* Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo Teste *t*.

^I Fator de conversão (N=6,25).

^{II} Fibra alimentar total = fibra insolúvel + fibra solúvel.

^{III} Carboidratos = 100 - (umidade + cinzas + proteínas + lipídeos).

^{IV} Valor de energia é expresso em Kcal/100g (Fator de Atwater).

A semente e farinha fibrosa apresentaram baixos teores de umidade, 4,55 % e 7,05 %, respectivamente. Os valores determinados de umidade estão dentro dos limites estabelecidos pelo CNNPA 12 - Padrões de Identidade e Qualidade para Alimentos e Bebidas (BRASIL, 1978), não podendo ser superior a 15 %. Segundo Rupollo *et al.* (2006), a determinação e controle da umidade nos grãos é fundamental para manutenção da sua qualidade, pois teor de umidade acima de 15 % favorece a incidência de fungos toxigênicos, pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo que essa incidência refere-se basicamente à contaminação vinda da lavoura.

Os resultados de umidade da semente e farinha fibrosa estão de acordo com os dados relatados na literatura, sendo que Martínez *et al.* (2012), Sandoval-Oliveros & Paredes-López (2013), Sargi *et al.* (2013) e Marineli *et al.* (2014) descreveram valores entre 4,50 % a 7,86 % para semente. Capitani *et al.* (2012) e Segura-Campos *et al.* (2013) relataram valores entre 6,17 % a 10,00 % para farinha fibrosa.

O teor de lipídeos na farinha fibrosa (9,90 %) foi significativamente menor do que na semente (30,56 %), sendo que esse resultado é esperado nas amostras, visto que a farinha fibrosa é um resíduo gerado do processo de extração do óleo da chia. Portanto, os resultados de lipídeos da semente e farinha fibrosa estão de acordo com os estudos prévios, que relataram valores entre 29,98 % a 32,50 % para semente (Peiretti & Gai, 2009; Ayerza & Coates, 2011; Martínez *et al.*, 2012; Sandoval-Oliveros & Paredes-López, 2013; Marineli *et al.*, 2014) e valores entre 8,75 % a 10,85 % (Capitani *et al.*, 2012; Coorey *et al.*, 2014) para farinha fibrosa.

Estudos demonstram, de acordo com Charalampopoulos *et al.* (2002) e Ragaee *et al.* (2006), que o teor de lipídeos da semente de chia é superior em média 10 vezes em relação aos principais cereais consumidos no Brasil, entre eles arroz (1,9 %), milho (3,9 %), trigo (2,0 %), sorgo (3,3 %) e cevada (2,31 %). Porém, Sargi *et al.* (2013) determinaram que o teor de lipídeos da semente de chia é inferior frente algumas sementes oleaginosas estudadas, tais como linhaça dourada (37,57 %), linhaça marrom (38,13 %), perilla branca (40,12 %) e perilla marrom (42,27 %).

O conteúdo de proteínas na farinha fibrosa (32,50 %) foi significativamente elevado comparado com a semente (23,50 %) devido à diminuição do seu conteúdo de lipídeos. Capitani *et al.* (2012), Segura-Campos *et al.* (2013), Coorey *et al.* (2014) obtiveram o conteúdo de proteínas da farinha fibrosa na faixa de 31,95 % a 34,01 %, enquanto Martínez *et al.* (2012), Sandoval-Oliveros & Paredes-López (2013), Sargi *et al.* (2013) e Marineli *et al.* (2014) relataram na faixa de 21,52 % a 25,32 % para semente. Sargi *et al.* (2013)

determinaram conteúdos similares de proteínas da semente de chia para semente de linhaça dourada (23,24%), linhaça marrom (24,42 %), perilla branca (24,18 %) e perilla marrom (25,38 %). Portanto, conclui-se que a semente de chia é uma importante fonte proteica.

Os teores de cinzas foram 4,55 % para semente e 5,86 % para farinha fibrosa. Comparando com a literatura, os resultados de cinzas encontram-se na faixa determinada por outros investigadores, sendo 4,07 % a 4,80 % para semente (Peiretti & Gai, 2009; Martínez *et al.*, 2012; Marineli *et al.*, 2014) e 5,85 % a 6,27 % para farinha fibrosa (Capitani *et al.*, 2012; Segura-Campos *et al.* 2013).

O teor de carboidratos na farinha fibrosa (44,69 %) foi significativamente elevado comparado com a semente (36,84 %) devido à redução do teor de lipídeos. O teor de carboidrato é calculado, na composição centesimal dos alimentos, aplicando-se a equação pela diferença (carboidratos = 100 - (umidade + cinzas + proteínas + lipídeos)), portanto no cálculo de carboidrato são requeridos os componentes do alimento, necessitando realizar variados procedimentos analíticos para a obtenção dos mesmos (BRASIL, 2003).

Os teores de fibra alimentar total, insolúvel e solúvel foram significativamente maiores na farinha fibrosa (40,90 %; 36,38 %; 4,52 %) do que na semente (35,50 %; 31,90 %; 3,60 %), respectivamente. Estudos têm demonstrado consistentemente que a maior ingestão diária de grãos integrais está associada com menor aumento do peso corporal ao longo do consumo (Esposito *et al.*, 2004; Harris Jackson *et al.*, 2014). Os alimentos ricos em fibras podem beneficiar no controle do peso corporal, devido à redução da absorção da energia consumida e aumento da excreção dos sais biliares em comparação com alimentos que contêm baixo teor de fibras (Brownlee *et al.*, 2016). O consumo de fibra alimentar solúvel reduz as respostas pós-prandiais da glicose após as refeições ricas em carboidratos, bem como a redução dos níveis de LDL (*Low Density Lipoprotein*)-colesterol e colesterol total (Weickert & Pfeiffer, 2008). Além disso, as fibras insolúveis contribuem para o aumento do volume do bolo fecal, redução do tempo de trânsito intestinal, retardo da absorção de glicose e retardo da hidrólise do amido (Weickert & Pfeiffer, 2008).

Alimentos contendo cereais e sementes oleaginosas contribuem em grande parte na ingestão calórica da população, uma vez que são consumidos mundialmente, por todas as faixas etárias, além de serem usados principalmente como matérias-primas para a indústria de alimentos. Os valores de energia (VE) obtidos pelos experimentos de Atwater & Bryant (1900), o qual nos referimos hoje como o fator Atwater, permitiram constatar que em média, cada grama de proteína ou de carboidrato libera 4 kcal de energia, enquanto que para cada grama de lipídeos são liberados o valor de 9 kcal. Desta forma, para obter o valor energético

pela relação estabelecida por Bryant & Atwater é aplicado a equação ($VE = 4C + 4P + 9L$), sendo necessário obter as quantidades, em gramas, de carboidratos (C), proteínas (P) e lipídeos (L) presentes em cada amostra (Buchholz & Schoeller, 2004). O valor energético da semente (516,40 kcal/100 g) é significativamente elevado em comparação com a farinha fibrosa (397,86 kcal/100 g) devido ao maior conteúdo de lipídeos.

O óleo da semente de chia é fonte de ácidos graxos essenciais, porém não é amplamente utilizado comercialmente, mesmo apresentando características que são adequadas para aplicações industriais. As características físico-químicas do óleo de chia são apresentadas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Características físico-químicas do óleo de chia.

Componentes	Óleo ^a
Índice de peróxido (mEq O ₂ /kg)	5,25 ± 0,01
Índice de acidez (g ácido oléico/100 g)	0,26 ± 0,01
Índice de iodo (g I ₂ /100 g)	203,96 ± 0,05
Índice de saponificação (mg KOH/g)	220,20 ± 0,03
Parâmetros de Cor	
<i>L</i> * ^I	76,19 ± 0,37
<i>a</i> * ^I	18,61 ± 0,23
<i>b</i> * ^I	123,09 ± 0,21
<i>Blue</i> ^{II}	0,50 ± 0,01
<i>Red</i> ^{II}	3,40 ± 0,01
<i>Yellow</i> ^{II}	70,00 ± 0,01
<i>Neutro</i> ^{II}	1,00 ± 0,01

^a Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (n=3).

^I Determinação da cor - método CIELAB.

^{II} Determinação da cor - método Lovibond.

O índice de peróxido do óleo foi 5,25 mEqO₂/kg óleo, sendo superior ao reportado por Ixtaina *et al.* (2012; 2015) que obteve valores de 1,0 a 2,0 mEqO₂/kg óleo. O índice de peróxido nos óleos vegetais determina os compostos que oxidam o iodeto de potássio a iodo, esses compostos, os peróxidos, são produtos primários da oxidação dos lipídeos. A oxidação é um processo autocatalítico e se desenvolve em aceleração crescente, pois fatores como temperatura, enzimas, luz e íons metálicos podem influenciar na formação de radicais livres nos óleos. O radical livre em contato com oxigênio molecular forma um

peróxido, que em reação com outra molécula lipídica oxidável, retira hidrogênio dela formando o hidroperóxido e outro radical livre (Choe & Min, 2006).

Os hidroperóxidos dão origem a dois radicais livres, capazes de atacar outras moléculas e formar mais radicais livres, dando assim uma reação em progressão geométrica (Adams, 1999). As moléculas formadas, contendo o radical livre, ao se romperem, formam produtos de peso molecular mais baixo (aldeídos, cetonas, ésteres, álcoois e hidrocarbonetos de cadeia curta), os quais são voláteis e responsáveis pelos odores da rancificação (Choe & Min, 2006).

Outro parâmetro importante para avaliar o óleo é o índice de acidez, o qual está diretamente relacionado com a natureza, qualidade, processamento, grau de pureza, e principalmente com a condição de conservação do óleo (Rios *et al.*, 2013). Portanto, o índice de acidez determina a quantidade de ácidos graxos livres advindos dos processos de hidrólise dos triacilgliceróis, por isso um elevado índice de acidez indica que o óleo está sofrendo quebras nas cadeias de triacilgliceróis, liberando seus constituintes principais.

O índice de acidez determinado no óleo de chia foi 0,26 g ácido oléico/100 g óleo, o qual está de acordo com os resultados reportados por outros estudos, que obtiveram valores entre 0,13 a 1,47 g ácido oléico/100 g óleo de chia (Martínez *et al.*, 2012; Ixtaina *et al.*, 2015; Bodoira *et al.*, 2017).

O índice de acidez e o índice de peróxido são descritos como parâmetros de referência para determinar a qualidade da conservação do óleo, portanto os valores obtidos neste estudo, estão de acordo com o padrão de qualidade dos óleos vegetais, o qual determina valor máximo de 3,30 g ácido oléico/100 g e 20 mEqO₂/kg, respectivamente (Codex Alimentarius, 2001).

Além disso, o índice de iodo é um método analítico para avaliar a degradação do óleo, pois está relacionado com a quantidade de duplas ligações presentes na amostra. Quanto maior a insaturação dos ácidos graxos, maior será sua capacidade de absorção de iodo, e consequente, maior será o índice de iodo (Moretto & Fett, 1998; Rios *et al.*, 2013). O índice de iodo (203,96 g I₂/100g) foi menor do que os valores publicados em outros estudos, enquanto o índice de saponificação (220,20 mg KOH/g) foi superior. O óleo de chia apresentou maior degradação em comparação com outros estudos. Ixtaina *et al.* (2011; 2012) e Bodoira *et al.* (2017) reportaram o índice de iodo na faixa de 207,0 a 212,40 g I₂/100 g e Ixtaina *et al.* (2011) obteve a faixa de 192,99 a 193,5 mg KOH/g para índice de saponificação.

Com relação a determinação da cor do óleo foi aplicado duas metodologias com objetivo de comparação com outros estudos, pois não existem padrões de cor para óleo de

chia. As medidas de cor CIELAB foram para L*; a*; b* (76,19; 18,61; 123,09), respectivamente. Ixtaina *et al.* (2011) reportaram para L*; a*; b* (42,85; -3,75; 25,90) para óleo de chia, sendo os valores muito inferiores aos obtidos nesse estudo. Os valores de cor Lovibond do óleo de chia foram 70,00Y/3,4R. O óleo de linhaça apresentou coloração mais aproximada com o óleo de chia, pois Choo *et al.* (2007) relataram medidas de cor CIELAB para L*; a*; b* (60,85; 7,63; 96,80) e Shim *et al.* (2015) citaram valores de cor Lovibond de 70,0Y/8,6R. A cor dos óleos vegetais comestíveis está associada diretamente com o conteúdo de pigmentos presentes, tais como carotenóides e clorofila, portanto observamos que o óleo de chia analisado apresentou maior conteúdo desses pigmentos.

Os carotenóides são tetraterpenos biosintetizados a partir de oito unidades de isopreno, sendo divididos em duas classes principais, carotenos e xantofilas. São responsáveis pela cor amarela, laranja ou avermelhada da maioria dos óleos vegetais, contudo sua concentração é baixa. Os principais carotenóides encontrados nos óleos vegetais são o β -caroteno, α -caroteno e licopeno, sendo o β -caroteno na sua grande maioria majoritário (Jorge, 2009). A **Tabela 3** apresenta os resultados obtidos de carotenóides totais e TBA (ácido 2-tiobarbitúrico) em semente, farinha fibrosa e óleo de chia.

O óleo de chia (2,04 $\mu\text{g/g}$) apresentou significativamente maior conteúdo de carotenóides totais, comparado a semente (0,39 $\mu\text{g/g}$) e a farinha fibrosa (0,92 $\mu\text{g/g}$). Ndolo & Beta (2013) relataram resultados similares aos da semente e farinha fibrosa para o conteúdo de carotenóides totais em cereais integrais, tais como trigo (0,81 $\mu\text{g/g}$), aveia (0,10 $\mu\text{g/g}$) e cevada (0,49 $\mu\text{g/g}$). Martínéz *et al.* (2015) apresentaram maior valor para o conteúdo de carotenóides totais no óleo de chia (5,41 $\mu\text{g/g}$). Entretanto, estudos têm apresentado ampla faixa de variação na composição dos óleos obtidos das sementes chia cultivadas em diferentes condições climáticas e localização geográfica (Ayerza & Coates, 2004).

Tabela 3. Teores de carotenóides e malondialdeído da semente, farinha fibrosa e óleo de chia.

Componentes	Chia *		
	Semente	Farinha Fibrosa	Óleo
TBA (mg MDA/kg)	0,79 $\pm$ 0,05 ^b	0,76 $\pm$ 0,07 ^b	0,40 $\pm$ 0,03 ^a
Carotenóides totais ($\mu\text{g/g}$)	0,39 $\pm$ 0,01 ^c	0,92 $\pm$ 0,01 ^b	2,04 $\pm$ 0,03 ^a

* Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

* Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os óleos e sementes oleaginosas podem sofrer o processo de oxidação primária, que leva a formação dos hidroperóxidos, os quais são compostos intermediários que se decompõe em vários produtos secundários, tais como os aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos de cadeia curta, alcóois e entre outros. Portanto, a determinação dos produtos de oxidação secundária é mais apropriada, uma vez que os produtos secundários de oxidação são responsáveis pelo odor de ranço. Por isso, o índice de espécies reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico é utilizado para avaliar a formação de produtos secundários da oxidação lipídica em alimentos. O método consiste na reação de duas moléculas de TBA (ácido 2-tiobarbitúrico) com uma molécula de MA (malondialdeído), formando um complexo MA-TBA de cor rosa com absorção máxima em 530 a 535nm. O MA é um produto secundário da oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados (Akoh & Min, 2008).

O óleo de chia (0,40 mg MDA/kg) apresentou significativamente menor conteúdo de malondialdeído, comparado a semente (0,79 mg MDA/kg) e a farinha fibrosa (0,76 mg MDA/kg), entretanto a semente e farinha não apresentaram diferença significativa entre si. Os valores de TBA das amostras de óleo, semente e farinha corresponderam ao um baixo grau de oxidação lipídica secundária. Porém, conforme apresentado na **Tabela 3 e Tabela 5**, o óleo de chia possui maior conteúdo de tocoferóis e carotenóides que a semente e farinha fibrosa, sendo que esses compostos são responsáveis em manter a estabilidade oxidativa do óleo, e impedir o processo de oxidação lipídica devido à sua ação antioxidante.

3.2 Composição dos ácidos graxos

A semente de chia tem sido incorporada à alimentação por conter constituintes importantes para saúde e nutrição humana, entre eles, o que apresenta maior destaque são os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), principalmente os ácidos graxos essenciais, que estão presentes em elevadas concentrações. Os PUFA desempenham um papel importante na prevenção e no tratamento de doenças crônicas, tais como hipertensão, doença arterial coronária, diabetes e câncer (Bodoira *et al.*, 2007).

Os ácidos graxos essenciais são constituintes importantes de todas as membranas celulares, pois alteram a fluidez da membrana, e assim determinam e influenciam o comportamento das enzimas e receptores ligados à membrana. Portanto o consumo de ácidos graxos essenciais é fundamental para sobrevivência, pois não são sintetizados pelo corpo humano (Das, 2006). Os mamíferos não apresentam enzimas capazes de inserir dupla ligação nas posições ω -6 e ω -3, respectivamente das cadeias hidrocarbonadas dos ácidos graxos

(Souza & Visentainer, 2012). Os ácidos graxos essenciais são o ácido linoléico (C18:2, ω -6) e o ácido linolênico (C18:3, ω -3).

A **Tabela 4** apresenta o perfil dos ácidos graxos do óleo, semente e farinha fibrosa de chia. Os principais ácidos graxos identificados nas amostras foram palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico. Os ácidos graxos essenciais, linoléico e linolênico, foram os ácidos graxos majoritários.

Tabela 4. Perfil dos ácidos graxos presentes na fração lipídica da chia.

Ácidos graxos (g/100g)	Chia *		
	Semente	Farinha Fibrosa	Óleo
C12:0 - Láurico	0,00	0,039 $\pm$ 0,010	0,00
C14:0 - Mirístico	0,053 $\pm$ 0,001 ^b	0,067 $\pm$ 0,004 ^a	0,056 $\pm$ 0,007 ^b
C15:0 - Pentadecanóico	0,036 $\pm$ 0,003 ^b	0,045 $\pm$ 0,001 ^a	0,041 $\pm$ 0,017 ^b
C16:0 - Palmítico	7,551 $\pm$ 0,005 ^b	8,568 $\pm$ 0,003 ^a	6,815 $\pm$ 0,002 ^c
C16:1 - Palmitoléico	0,073 $\pm$ 0,003 ^a	0,074 $\pm$ 0,003 ^a	0,064 $\pm$ 0,001 ^b
C17:0 - Margárico	0,053 $\pm$ 0,001 ^b	0,082 $\pm$ 0,010 ^a	0,055 $\pm$ 0,006 ^b
C17:1 - Margaroleico	0,027 $\pm$ 0,003 ^b	0,036 $\pm$ 0,001 ^a	0,029 $\pm$ 0,002 ^b
C18:0 - Esteárico	3,462 $\pm$ 0,009 ^b	3,744 $\pm$ 0,010 ^a	3,295 $\pm$ 0,006 ^c
C18:1 - Oléico	7,632 $\pm$ 0,011 ^b	8,721 $\pm$ 0,023 ^a	6,844 $\pm$ 0,002 ^c
C18:2 - Linoléico	20,291 $\pm$ 0,040 ^b	22,348 $\pm$ 0,035 ^a	19,080 $\pm$ 0,005 ^c
C18:3 - Linolênico	60,130 $\pm$ 0,071 ^b	55,326 $\pm$ 0,110 ^c	63,020 $\pm$ 0,007 ^a
C20:0 - Araquídico	0,311 $\pm$ 0,001 ^b	0,366 $\pm$ 0,006 ^a	0,318 $\pm$ 0,004 ^b
C20:1 - Eicosenóico	0,142 $\pm$ 0,001 ^b	0,168 $\pm$ 0,005 ^a	0,141 $\pm$ 0,007 ^b
C22:0 - Behênico	0,127 $\pm$ 0,028 ^b	0,163 $\pm$ 0,031 ^a	0,123 $\pm$ 0,009 ^b
C24:0 - Lignocérico	0,106 $\pm$ 0,016 ^b	0,249 $\pm$ 0,021 ^a	0,115 $\pm$ 0,004 ^b
SFA total	11,701 $\pm$ 0,010 ^b	13,325 $\pm$ 0,012 ^a	10,821 $\pm$ 0,041 ^c
MUFA total	7,874 $\pm$ 0,021 ^b	9,001 $\pm$ 0,018 ^c	7,079 $\pm$ 0,020 ^a
PUFA total	80,424 $\pm$ 0,010 ^b	77,681 $\pm$ 0,011 ^c	82,101 $\pm$ 0,021 ^a
Razão (ω -6/ ω -3)	0,337 $\pm$ 0,001 ^b	0,404 $\pm$ 0,001 ^a	0,303 $\pm$ 0,001 ^c

* Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

* Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa (p<0,05) pelo teste de Tukey.

SFA = ácidos graxos saturados; MUFA = ácidos graxos moinsaturados; PUFA = ácidos graxos poli-insaturados.

O óleo apresentou significativamente maior perfil de PUFA (82,10 g/100 g) e menor perfil de SFA (10,82 g/100 g) e MUFA (7,08 g/100 g). Os resultados do perfil de ácidos graxos obtidos do óleo estão de acordo com outros estudos (Ixtaina *et al.*, 2011; Marineli *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2015; Bodoira *et al.*, 2017), que relataram a faixa de

valores de PUFA de 81,90 a 84,90 g/100 g, MUFA de 5,90 a 7,32 g/100 g e SFA de 9,80 a 11,20 g/100 g, sendo o ácido linoléico de 18,23 a 20,30 g/100 g e ácido linolênico de 61,80 a 64,50 g/100 g.

Comparando os ácidos graxos do óleo de chia com azeite de oliva extra-virgem (Silva *et al.*, 2010), o azeite apresenta baixo perfil de PUFA (7,20 g/100 g) e elevado perfil de MUFA (77,80 g/100 g), tendo o ácido oléico (77,40 g/100 g) como ácido graxo majoritário. Portanto, o óleo de chia é uma fonte importante de ácidos graxos poli-insaturados e principalmente de ácidos graxos essenciais.

A semente de chia apresentou o total de PUFA de 80,42 g/100 g, SFA de 11,70 g/100 g, MUFA de 7,87 g/100 g, ácido linoléico de 20,29 g/100 g e ácido linolênico de 60,13 g/100 g. Valores similares de ácidos graxos em semente de chia foram relatados por Ciftci *et al.* (2012) que obtiveram para PUFA de 80,40 g/100 g, ácido linoléico de 20,37 g/100 g e ácido linolênico de 59,76 g/100 g. Do mesmo modo, comparando o perfil de ácidos graxos da semente de chia com outras sementes oleagionosas (Ciftci *et al.*, 2012) é possível observar que o conteúdo do ácido linolênico é semelhante ao da semente de linhaça (58,20 g/100 g) e perilla (60,93 g/100 g). Porém o conteúdo de PUFA é em média 7,6 % maior na semente de chia, pois a semente de linhaça e perilla apresentam 73,63 g/100 g e 75,85 g/100 g de PUFA, respectivamente.

Na farinha fibrosa, o total de ácidos graxos foi de 77,68 g/100 g de PUFA, 13,32 g/100 g de SFA, 9,0 g/100 g de MUFA, 22,35 g/100g de ácido linoléico e 55,33 g/100 g de ácido linolênico. Apesar do baixo teor de lipídios na farinha (9,90 %), pequenas alterações são observadas no perfil dos seus ácidos graxos, apresentando redução de 3 % dos ácidos graxos poli-insaturados em comparação com a semente. Portanto, a farinha fibrosa apesar de apresentar baixo teor de lipídeos comparada a semente, o seu conteúdo lipídico possui elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados.

3.3 Composição dos tocoferóis

Os tocoferóis são antioxidantes naturais, sendo os óleos vegetais e sementes oleaginosas uma das suas fontes principais. Tocoferóis ocorrem em uma variedade de isômeros que diferem na estrutura, de acordo com o número e a localização dos grupos substituintes no anel cromanol, nomeados de α -, β -, γ - e δ -tocoferol, os quais desempenham funções importantes na reprodução e em mecanismos antioxidantes de tecidos animais e vegetais (Guinazi *et al.*, 2009). A **Tabela 5** apresenta a composição dos tocoferóis na fração lipídica da semente, farinha fibrosa e óleo de chia.

Tabela 5. Composição dos tocoferóis presentes na fração lipídica da chia.

Tocoferóis (mg/kg)	Chia *		
	Semente	Farinha Fibrosa	Óleo
α -tocoferol	ND	ND	ND
β -tocoferol	ND	ND	ND
γ -tocoferol	$110,74 \pm 0,07^b$	$30,37 \pm 0,01^c$	$420,16 \pm 0,38^a$
δ -tocoferol	$3,20 \pm 0,01^b$	$1,10 \pm 0,01^c$	$30,49 \pm 0,03^a$

* Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=3). ND = não detectado.

* Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A semente, farinha fibrosa e óleo apresentaram diferença significativa no teor de γ -tocoferol e δ -tocoferol, respectivamente. O α -tocoferol e β -tocoferol não foram detectados nas amostras. A farinha fibrosa apresentou baixo conteúdo de tocoferóis, sendo 30,37 mg/kg farinha de γ -tocoferol e 1,10 mg/kg farinha de δ -tocoferol, devido ao seu menor conteúdo lipídico com relação à semente. A semente apresentou 110,74 mg/kg semente de γ -tocoferol e 3,20 mg/kg semente de δ -tocoferol.

O óleo de chia apresentou maior teor de γ -tocoferol (420,16 mg/kg óleo) e δ -tocoferol (30,49 mg/kg óleo) em comparação com a semente e farinha. Os óleos vegetais comestíveis possuem altas concentrações de tocoferóis, sendo que esse conteúdo está diretamente relacionado com perfil lipofílico dessas vitaminas. O valor de γ -tocoferol no óleo de chia está de acordo com Ixtaina *et al.* (2015; 2012; 2011) e Ciftci *et al.* (2012) que reportaram a faixa de 415,0 a 463 mg/kg óleo para γ -tocoferol e 15 a 22 mg/kg óleo para δ -tocoferol. Tuberoso *et al.* (2007) relataram maior teor de γ -tocoferol para óleo de linhaça (575,0 mg/kg óleo) e canola (527,30 mg/kg óleo) e menor conteúdo para o azeite extra-virgem (4,80 mg/kg óleo) em comparação ao óleo de chia.

3.4 Composição dos minerais

O ser humano necessita de pelo menos 22 elementos minerais para realizar as atividades metabólicas, os quais são fornecidos por uma dieta adequada. No entanto, estima-se que mais de 60 % dos 6 bilhões de pessoas do mundo são deficientes em ferro (Fe), e mais de 30% são deficientes em zinco (Zn), e 15 % são deficientes em selênio (Se) (White & Broadley, 2009). Além disso, as deficiências de cálcio (Ca), magnésio (Mg) e cobre (Cu) são comuns em muitos países desenvolvidos e em desenvolvimento (White & Broadley, 2009).

Atualmente, a deficiência mineral é atribuída à produção de cultivos em áreas com baixa fito-disponibilidade mineral e/ou consumo alimentar com concentrações minerais não satisfatórias, agravadas pela falta de consumo de produtos marinhos na dieta (Graham *et al.*, 2007; White & Broadley, 2009). Os teores de minerais em sementes oleaginosas também são afetados pela condições do solo, variações climáticas durante o crescimento, uso de fertilizantes e estágio de maturidade no momento da colheita. A **Tabela 6** apresenta a composição de minerais presentes na semente, farinha fibrosa e óleo de chia.

Tabela 6. Composição dos minerais na semente e farinha fibrosa de chia.

Minerais (mg/kg)	Chia *		RID **
	Semente	Farinha Fibrosa	mg/dia
Cálcio	12.752,01 ± 141,95 (0,89) ^b	14.480,60 ± 110,93 (0,76) ^a	1000
Cobre	17,07 ± 0,59 (3,45) ^b	21,60 ± 0,24 (1,11) ^a	0,9
Ferro	84,34 ± 0,69 (0,81) ^b	150,13 ± 0,80 (0,53) ^a	8-18
Magnésio	3.771,03 ± 8,26 (0,21) ^b	4.956,15 ± 62,39 (1,25) ^a	320-420
Manganês	29,42 ± 0,12 (0,40) ^b	44,60 ± 0,24 (0,53) ^a	1,80-2,30
Potássio	8.898,99 ± 41,09 (0,46) ^b	10.349,50 ± 58,29 (0,56) ^a	4700
Zinco	64,25 ± 0,42 (0,65) ^b	96,76 ± 0,39 (0,40) ^a	8-11

* Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (% coeficiente de variação) de n=3.

* Média seguida de letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa (p<0,05) pelo Teste *t*.

** RID - Referência de Ingestão Diária (DRI, 1997; DRI, 2001; DRI, 2005).

A farinha fibrosa apresentou significativamente maior conteúdo de minerais em comparação com a semente. Capitani *et al.* (2012) relataram valores inferiores na farinha fibrosa para Ca (5615 mg/kg), Mg (4624 mg/kg), Fe (117,70 mg/kg), Zn (92,80 mg/kg) e Cu (18,7 mg/kg) comparado aos resultados observados no presente estudo. O consumo de 100 g/dia de farinha fibrosa ou semente de chia fornecem a quantidade diária necessária de minerais para manutenção das atividade metabólicas no corpo humano (**Figura 6**).

Em relação ao conteúdo mineral da semente de chia, Silva *et al.* (2017) obtiveram valores similares de Fe (76,90 mg/kg) e Mn (24,80 mg/kg) e inferiores para Zn (37,60 mg/kg). Além disso, Bushway *et al.* (1981) relataram para semente de chia valores similares para K (8900 mg/kg), Mg (4000 mg/kg), Cu (24,50 mg/kg) e Zn (74 mg/kg), entretando inferior para Ca (8700 mg/kg), e superior para Mn (58 mg/kg). As diferenças entre as

sementes de chia podem ser atribuídas à localização geográfica, tipo de solo e às condições de crescimento em que foram cultivadas (Silva *et al.*, 2017).

3.5 Identificação dos compostos fenólicos por HPLC-DAD-ESI-MS/MS

Estudos sobre a composição química de produtos vegetais são sempre um desafio, uma vez que grande número de diferentes famílias de compostos podem estar presentes, em diferentes concentrações e formas, tais como na forma livre ou ligada à outras estruturas. A carência de dados sobre a composição química dos produtos de chia é reconhecida e a medida que o seu consumo aumenta, torna-se cada vez mais importante realizar estudos de caracterização para identificar os compostos bioativos presentes na mesma, bem como estabelecer parâmetros de controle de qualidade para avaliar os produtos comercializados (sementes, farinha fibrosa e óleo) que estão atualmente disponíveis para os consumidores.

O ensaio de Folin Ciocalteu tem sido amplamente realizado com a finalidade de quantificação e comparação do conteúdo fenólico total entre amostras, mas a informação obtida nesse ensaio não especifica as principais classes de compostos fenólicos presentes nas amostras, sendo importante identificar os compostos fenólicos presentes nas mesmas e correlacioná-los com a bioatividade e os possíveis efeitos na melhoria da saúde.

Diferentes métodos têm sido publicados para a identificação de compostos fenólicos, porém o mais amplamente utilizado é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de arranjo de diodos (DAD) acoplada à espectrometria de massas (MS), o qual é um método eficiente, rápido e reprodutível.

A evolução das metodologias de espectrometria de massas com maior sensibilidade e capacidade de rastreio rápido, utilizando espectrometria de massas em tandem (MSⁿ) e equipamentos de massas exatas, contribuem para a identificação de um número maior de compostos em cromatogramas complexos, uma vez que há falta de substâncias de referência para muitos compostos naturais. Outros detectores, como o detector eletroquímico (ED), também são utilizados, pois são sensíveis, seletivos e podem elucidar compostos que contribuem para as propriedades antioxidantes das amostras (Bravo *et al.*, 2006; Dobes *et al.*, 2013).

Na tentativa de ajudar na identificação dos diferentes compostos fenólicos presentes nas amostras, os extratos brutos foram submetidos à um processo de hidrólise ácida. O tratamento de hidrólise pode ser utilizado para diferentes fins, dependendo do passo em que é aplicado. Se for utilizado durante o processo de extração, pode ajudar a elucidar a quantidade de compostos fenólicos ligados à outras estruturas na parede celular, os quais não

são facilmente extraídos. Em nosso estudo, o processo de hidrólise foi aplicado no extrato preparado em uma tentativa de hidrolisar compostos ligados e identificar compostos fenólicos conjugados. Os cromatogramas dos extratos brutos e hidrolisados da semente de chia, farinha de fibra e óleo são apresentados na **Figura 1** e **Figura 2**, respectivamente.

Os cromatogramas obtidos dos extratos estudados foram complexos, mas as condições de HPLC utilizadas permitiram uma boa separação dos compostos sem qualquer variação significativa entre as duplicatas das amostras. As condições de MS foram otimizadas e a análise foi realizada no modo SCAN para detectar a razão m/z correspondente ao íon precursor $[M-H]^-$. Se as condições de ionização forem adequadas, esta razão m/z deve corresponder ao pico mais intenso nos espectros de massa, contudo esta situação é difícil de ocorrer para todos os compostos presentes, e alguma fragmentação na fonte de íons é responsável por uma diminuição no sinal correspondente ao íon precursor, dificultando o estudo dos espectros MS.

A **Tabela 7** apresenta a lista dos 31 compostos identificados através do LC-DAD-ESI-MS/MS juntamente com o seu tempo de retenção (t_R), λ máximo de absorção no UV, íon precursor, íons produto MS/MS, tipo de matriz onde eles foram encontrados e as referências para apoiar a identificação. Os compostos foram numerados por sua ordem de eluição, uma vez que a maior parte deles, não foram encontrados em todas as amostras.

Nos extratos brutos de semente e farinha fibrosa foram identificados 14 ácidos fenólicos, sendo 13 deles ácidos hidroxicinâmicos e 1 hidroxibenzóico. Nos extratos hidrolisados de semente e farinha fibrosa foram identificados 21 ácidos fenólicos, sendo 19 hidroxicinâmicos, 1 hidroxibenzaldeído e 1 hidroxibenzóico.

No extrato bruto do óleo de chia foram identificados 2 ácidos hidroxicinâmicos e 1 terpeno e nos extratos hidrolisados foram identificados 3 ácidos hidroxicinâmicos. Nos extratos hidrolisados da semente, farinha fibrosa e óleo identificou-se 1 álcool fenólico.

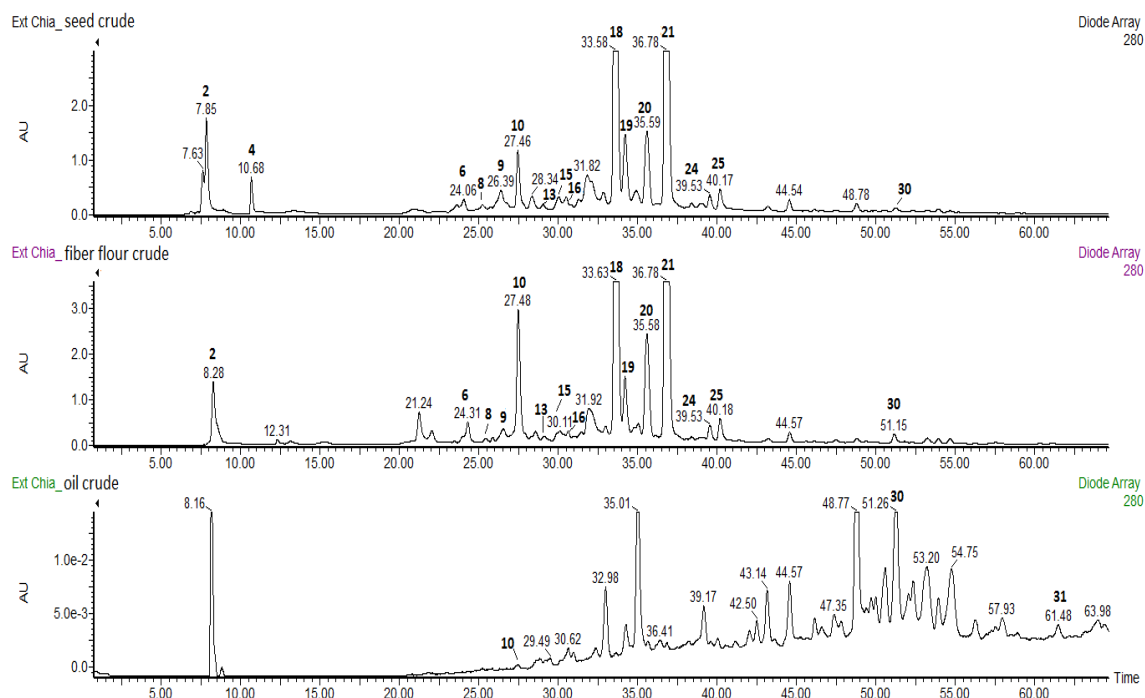


Figura 1. Perfil cromatográfico em 280 nm dos extratos brutos da semente, farinha fibrosa e óleo de chia.

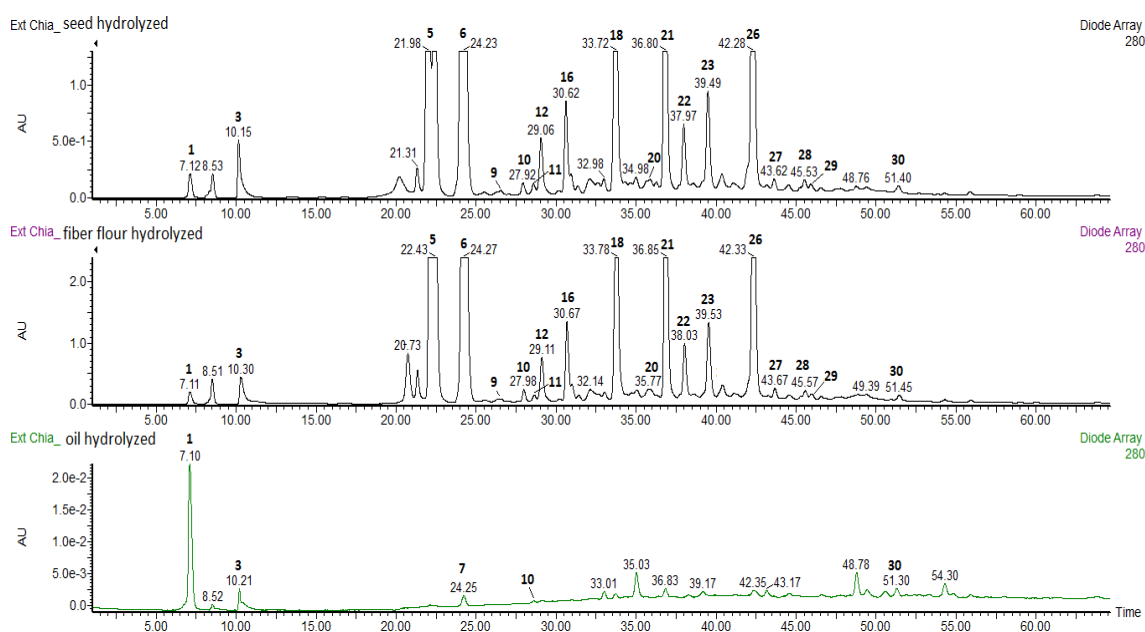


Figura 2. Perfil cromatográfico em 280 nm dos extratos hidrolisados da semente, farinha fibrosa e óleo de chia.

Tabela 7. Caracterização dos compostos fenólicos por HPLC–DAD–ESI–MS/MS nos extratos da semente, farinha fibrosa e óleo de chia.

Pico	t _R (min)	λ _{max} (nm)	[M–H] [–] (m/z)	HPLC–DAD–ESI–MS/MS [m/z] (% pico base)	Identificação	Grupo de compostos	Extratos*	Referências
1	7,11	280	195	[195]: 97(100), 141(30)	Hidroxitirosol Acetato	Álcool Fenólico	SH, FH, OH	Bajoub <i>et al.</i> , 2016 ; Tasioula-Margari & Tsabolatidou, 2015.
2	7,85		191	[191]: 87(100),111(65), 85(32)	Ácido Quínico	Ácido Orgânico	SC, FC	Gómez-Romero <i>et al.</i> , 2010; Spínola <i>et al.</i> , 2015.
3	10,21		191	[191]: 111(100), 87(60), 85(30), 173(10)	Ácido Cítrico	Ácido Orgânico	SH, FH,OH	Gómez-Romero <i>et al.</i> , 2010; Spínola <i>et al.</i> , 2015.
4	10,68		191	[191]: 111(100),87(15), 173(15), 85(10)	Ácido Isocítrico	Ácido Orgânico	SC	Gómez-Romero <i>et al.</i> , 2010.
5	21,98- 22,42	283	333	[333]: 179(100),123(30),197(20),135(15),153(10)	Ácido 9-Oxo-[(3,4-dihidroxifenil) metanoil]-3,4;dihidroxi-benzenopropanóico	Ácido Hidroxicinâmico	SH, FH	Liu <i>et al.</i> , 2007 ^b ; Guo <i>et al.</i> , 2015.
6	24,23	284	197	197]: 123(100),135(98),179(30)	Danshensu	Ácido Hidroxicinâmico	SC, FC, SH, FH	Zeng <i>et al.</i> , 2006; Liu <i>et al.</i> , 2007 ^b ; Nuengchamnong <i>et al.</i> , 2011; Ruan <i>et al.</i> , 2012.
7	24,25	284	221	[221]: 163(100),119(30)	Derivado do Ácido p-Cumárico	Ácido Hidroxicinâmico	OH	Hossain <i>et al.</i> , 2010.
8	25,37	262	359	[359]: 197(100),182(80), 179(60), 153(40), 135(30)	Ácido Siríngico-glucosídeo	Ácido Hidroxibenzóico	SC, FC	Hossain <i>et al.</i> , 2010; Abu-Reidah <i>et al.</i> , 2013.
9	26,39	328	311	[311]: 179(100),135(40)	Ácido Caféico-arabinosídeo	Ácido Hidroxicinâmico	SC, FC, SH, FH	Zeng <i>et al.</i> , 2006; Rubió <i>et al.</i> 2012.
10	27,48	280 312	295	[295]: 105(100),101(42), 123 (15), 73(10), 197(10)	Derivado do Danshensu	Ácido Hidroxicinâmico	SC, FC,OC, SH, FH,OH	Zeng <i>et al.</i> , 2006.

11	28,59	279	137	[137]: 108(100), 136(60), 92(30), 109(10)	Protocatecuico Aldeído	Ácido Hidroxibenzaldeído	SH, FH	Zeng <i>et al.</i> , 2006; Liu <i>et al.</i> , 2007 ^b .
12	29,06	280	211	[211]: 123(100), 179 (15), 197(10), 135(10)	Danshensu Metil Éster	Ácido Hidroxicinâmico	SH, FH	Zeng <i>et al.</i> , 2006; Chen <i>et al.</i> , 2011.
13	29,09	276 320	339	[339]: 179(100), 211(42), 123 (15), 135(10)	Derivado do Ácido Caféico	Ácido Hidroxicinâmico	SC, FC	Cvetkovikj <i>et al.</i> , 2013.
14	29,92	326	153	[153]: 109(100),108(50)	Ácido Protocatecuico	Ácido Hidroxibenzóico	SH, FH	Zeng <i>et al.</i> , 2006; Liu <i>et al.</i> , 2007 ^b ; Hossain <i>et al.</i> , 2010; Chen <i>et al.</i> , 2011; Zhang <i>et al.</i> 2014.
15	30,04	328	325	[325]: 193(100),134(48),149(25),178(15)	Ácido Ferúlico-arabinosídeo	Ácido Hidroxicinâmico	SC, FC, SH, FH	Rubió <i>et al.</i> , 2012.
16	30,62	321	179	[179]: 135(100)	Ácido Caféico	Ácido Hidroxicinâmico	SC, FC, SH, FH	Zeng <i>et al.</i> , 2006; Liu <i>et al.</i> , 2007 ^b ; Hossain <i>et al.</i> , 2010; Chen <i>et al.</i> , 2011; Nuengchamnong <i>et al.</i> , 2011; Ruan <i>et al.</i> , 2012; Guan <i>et al.</i> , 2014; Zhang <i>et al.</i> 2014.
17	32,61	288 326	325	[325]: 163(100),119(30)	Ácido p-Coumárico-glucosídeo	Ácido Hidroxicinâmico	SH, FH	Hossain <i>et al.</i> , 2010; Rubió <i>et al.</i> , 2012.
18	33,58	319	521	[521]: 359(100),323(45),161(30), 197(10), 179(5)	Ácido Rosmarínico-glucosídeo	Ácido Hidroxicinâmico	SC, FC, SH, FH	Guan <i>et al.</i> , 2014; Borrás-Linares <i>et al.</i> , 2014.
19	34,26	286 315	717	[717]: 519(100),475(48),339(25),537(20), 365(15),321(10)	Ácido Salvianólico E	Ácido Hidroxicinâmico	SC, FC, SH, FH	Zeng <i>et al.</i> , 2006; Liu <i>et al.</i> , 2007 ^b ; Zhu <i>et al.</i> 2007; Ruan <i>et al.</i> , 2012; Zhang <i>et al.</i> 2014.
20	35,60	321	505	[505]: 323(100),343(38),161(35),179(15),181(10), 135(5)	Danshensu-ramnosídeo-glucosídeo	Ácido Hidroxicinâmico	SC, FC, SH, FH	Zeng <i>et al.</i> , 2006.

21	36,78	231 328	359	[359]: 161(100),197(28),179(12),73(5),135(2)	Ácido Rosmarínico	Ácido Hidroxicinâmico	SC, FC, SH, FH	Zeng <i>et al.</i> , 2006; Liu <i>et al.</i> , 2007 ^b ; Hossain <i>et al.</i> , 2010; Chen <i>et al.</i> , 2011; Nuengchamnong <i>et al.</i> , 2011; Ruan <i>et al.</i> , 2012; Cvetkovikj <i>et al.</i> , 2013; Guan <i>et al.</i> , 2014; Zhang <i>et al.</i> 2014.
22	37,97	284 320	535	[535]: 373(100),179(10)	Ácido Metil Rosmarínico-glucosídeo	Ácido Hidroxicinâmico	SH, FH	Zeng <i>et al.</i> , 2006; Lecomte <i>et al.</i> , 2010; Chen <i>et al.</i> , 2011.
23	39,49	285 325	193	[193]: 134(100),161(30),178(10), 149(10)	Ácido Ferúlico	Ácido Hidroxicinâmico	SH, FH	Sánchez-Rabaneda <i>et al.</i> , 2003; Rubió <i>et al.</i> , 2012; Becerra-Herrera <i>et al.</i> , 2014.
24	39,53	284 315	343	[343]:135(100),161(80),145(75),197(70),179(45), 123(25)	Danshensu-ramnosídeo	Ácido Hidroxicinâmico	SC, FC	Zeng <i>et al.</i> , 2006; Liu <i>et al.</i> , 2007 ^b .
25	40,17	284 328	373	[373]: 197(100),135(65), 175(50), 179(20),161(15),123(10)	Danshensu-glucuronídeo	Ácido Hidroxicinâmico	SC, FC	Zeng <i>et al.</i> , 2006; Liu <i>et al.</i> , 2007 ^b .
26	42,28	232 284	373	[373]: 179(100),135(25),161(10)	Ácido Metil Rosmarínico	Ácido Hidroxicinâmico	SH, FH	Zeng <i>et al.</i> , 2006; Lecomte <i>et al.</i> , 2010; Chen <i>et al.</i> , 2011.
27	43,62	311	505	[505]: 311(100),293(75),267(30)	Metil Salvianólico C	Ácido Hidroxicinâmico	SH, FH	Zeng <i>et al.</i> , 2006; Zhu <i>et al.</i> , 2007.
28	45,53	282 326	357	[357]: 179(100),161(75),135(30)	Derivado do Ácido Caféico	Ácido Hidroxicinâmico	SH, FH	Cvetkovikj <i>et al.</i> , 2013.
29	45,92	284 326	387	[387]: 193(100),134(30),149(20)	Ácido Ferúlico Truxílico	Ácido Hidroxicinâmico	SH, FH	Chandrasekara & Shahidi, 2011.
30	51,21	304	353	[353]: 353 (100), 191(20)	Ácido Cafeoilquínico	Ácido Hidroxicinâmico	SC, FC, OC, SH, FH, OH	Ruan <i>et al.</i> 2012.
31	61,48	284	329	[329]: 285(100)	Carnosol	Diterpeno Fenólico	OC	Hossain <i>et al.</i> , 2010; Cvetkovikj <i>et al.</i> , 2013; Kontogianni <i>et al.</i> , 2013; Borrás-Linares <i>et al.</i> , 2014.

* SC= extrato bruto semente, FC= extrato bruto farinha fibrosa, OC= extrato bruto óleo, SH= extrato hidrolisado semente, FH= extrato hidrolisado farinha fibrosa, OH= extrato hidrolisado óleo.

3.5.1. Álcool fenólico

O composto 1 ($t_R=7,11$ min) com $[M-H]^-$ íon precursor de razão m/z 195 foi identificado como hidroxitirosol acetato, apresentando íons fragmento com razão m/z 97 e 141 (Tasioula-Margari & Tsabolatidou 2015; Bajoub *et al.*, 2016). O hidroxitirosol acetato tem sido reportado principalmente em azeite (Tsimidou *et al.*, 2014; Ballus *et al.*, 2015) sendo um importante antioxidante.

3.5.2. Ácidos orgânicos

Nos tempos de retenção (t_R) do início dos cromatogramas dos extratos metanólicos foram detectados compostos polares, tais como os ácidos orgânicos. Os compostos 2 ($t_R=7,85$ min), 3 ($t_R=10,21$ min) e 4 ($t_R=10,68$ min) com $[M-H]^-$ íon precursor m/z 191 foram identificados como ácido quínico, ácido cítrico, ácido isocítrico, respectivamente, de acordo com seus íons fragmento (Gómez-Romero *et al.*, 2010; Spínola *et al.*, 2015). Spínola *et al.* (2015) reportaram a presença do ácido quínico e ácido cítrico em sucos de morangos, limão e cherimóia. Borrás Linares *et al.* (2011; 2014) identificaram ácido quínico em plantas da família *Lamiaceae*.

3.5.3. Ácidos hidroxicinâmicos

Na **Figura 3** são apresentados as estruturas químicas dos principais ácidos hidroxicinâmicos identificados nas amostras de chia. O ácido caféico desempenha um importante papel, sendo a principal molécula a partir da qual se obtêm diferentes derivados, bem como o danshensu, o qual é um composto monômero, pois é a forma hidratada do ácido caféico (Liu *et al.*, 2007^a; Liu *et al.*, 2007^b).

O ácido rosmarínico é um dímero derivado do ácido caféico, pois corresponde a uma unidade de ácido caféico e uma unidade de danshensu ligados via ligação éster (Nuengchamnong *et al.*, 2011). O ácido salvianólico C é um trímero, pois contém três anéis fenil em sua estrutura química e seu espectro de MS apresenta característica de fragmentação de danshensu (m/z 293: $M-H-198$) e ácido caféico (m/z 311: $M-H-180$), conforme reportado por Zeng *et al.* (2006) e Liu *et al.* (2007^b). O ácido salvianólico E é um tetrâmero, pois contém quatro grupamento fenil em sua estrutura química (Zeng *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007^b).

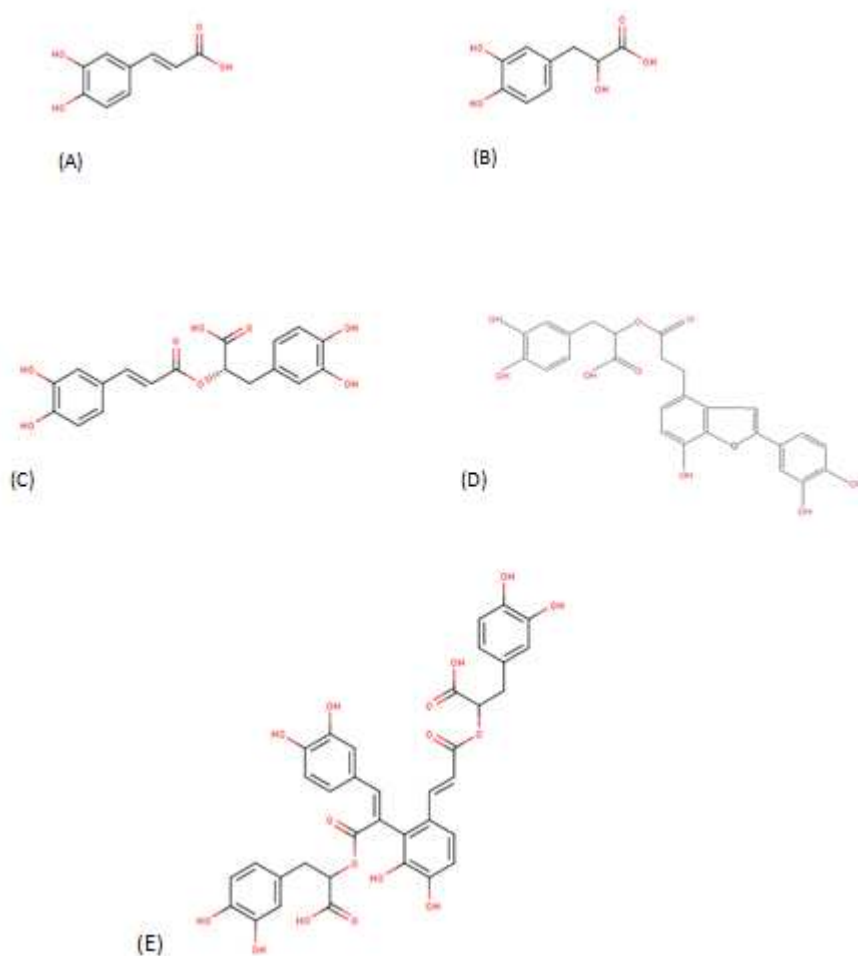


Figura 3. (A) ácido caféico, (B) danshensu, (C) ácido rosmarínico, (D) ácido salvianólico C, (E) ácido salvianólico E.

O composto 16 ($t_R = 30,62$ min) foi identificado como sendo o ácido caféico, pois apresenta íon precursor $[M-H]^-$ m/z 179 (**Figura 4**) e íon produto m/z 135 devido à perda de uma molécula de CO_2 (-44), $[M-H-CO_2]^-$ (Zeng *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2011; Nuengchamnong *et al.*, Guan *et al.*, 2014). O ácido caféico tem sido relatado na família *Lamiaceae*, em espécies como *Salvia miltiorrhiza*, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum*, *Thymus vulgaris* (Liu *et al.*, 2007^b; Hossain *et al.*, 2010; Ruan *et al.*, 2012) e a sua presença também foi relatada na semente de chia (Reyes-Caudillo *et al.*, 2008; Capitani *et al.*, 2012; Martínez-Cruz & Paredes-López, 2014). Entre os benefícios para a saúde do consumo do ácido caféico, estão descritos o efeito hipoglicemiante (Chang *et al.*, 2015), efeito antiprurítico (Pradhananga *et al.*,

2015), atividade anticancerígena (Nasr Bouzaiene *et al.*, 2015) e atividade hepatoprotetora (Yang *et al.*, 2013).

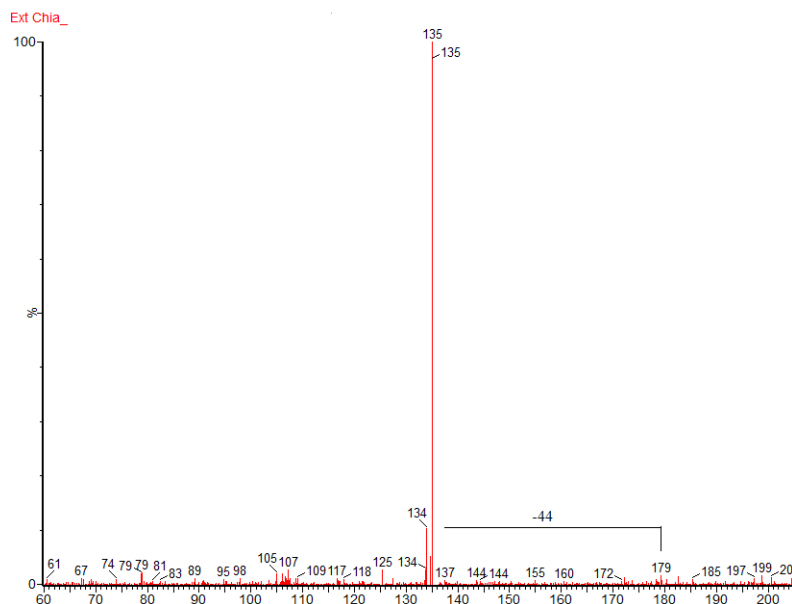


Figura 4. Espectro MS do ácido caféico.

Os derivados do ácido caféico também foram encontrados nos extratos analisados. O ácido caféico-arabinosídeo ($t_R = 26,39$ min) com íon precursor $[M-H]^-$ m/z 311 (composto 9) apresentou íon produto m/z 179, correspondente à perda de um resíduo arabinosídeo (132 Da), conforme reportado por Zeng *et al.* (2006) e Rubió *et al.* (2012). O composto 13 ($t_R = 29,09$ min) e o composto 28 ($t_R = 45,53$ min) apresentaram íon precursor $[M-H]^-$, m/z 339 e m/z 357, respectivamente, e íon produto m/z 179, sugerindo que os mesmos são derivados do ácido caféico, de acordo com Cvetkovikj *et al.* (2013).

A identificação do danshensu ($t_R = 24,23$ min, composto 6) com íon precursor $[M-H]^-$ m/z 197 (**Figura 5**) foi obtida por comparação dos principais íons produto formado na fragmentação durante os experimentos MS^2 (m/z 123, 135 e 179), como descritos na literatura por Zeng *et al.* (2006). Danshensu é um polifenol simples (ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) láctico) correspondendo a forma hidratada do ácido caféico (Liu *et al.*, 2007^a, 2007^b). De acordo com a **Figura 5**, observa-se a perda de uma molécula de H_2O (-18), $[M-H-H_2O]^-$ (m/z 179), e a perda de uma molécula de CO_2 (-44), $[M-H-CO_2]^-$ (m/z 135). Este composto tem sido relatado em plantas da família

Lamiaceae (Liu *et al.*, 2007^b, Chen *et al.*, 2011; Nuengchamnong *et al.*, 2011; Ruan *et al.*, 2012). Estudos têm demonstrado que o danshensu apresenta potente atividade antioxidante contra os danos peroxidativos da biomembrana e efeitos cardioprotetores (Zhao *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2011).

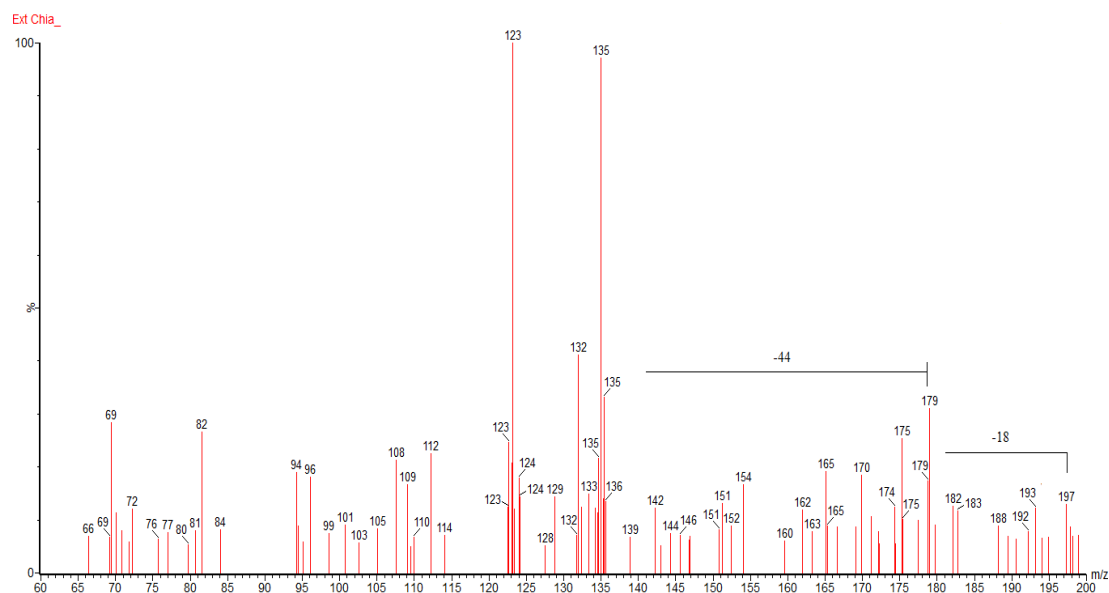


Figura 5. Espectro MS do danshensu.

Nos extratos, os derivados de danshensu foram detectados em diferentes tempos de retenção, apresentando um padrão de fragmentação característico deste composto, com íons produto m/z 123, 135 e 179. O danshensu metil éster (t_R = 29,06 min) com íon precursor $[M-H]^-$ m/z 211 (composto 12) foi identificado em *Salvia miltiorrhiza* por Zen *et al.* (2006) e Chen *et al.* (2011), e o espectro MS² demonstra o íon produto m/z 197 $[M-CH_3]^-$. O danshensu-ramnosídeo (t_R = 39,53 min) apresentou íon precursor $[M-H]^-$ m/z 343 (composto 24) com íon produto m/z 197, correspondendo à perda de um resíduo ramnosídeo (146 Da). O composto 25 (t_R = 40,17 min) com íon precursor $[M-H]^-$ m/z 373 perdeu um resíduo glucuronídeo (176 Da) produzindo o íon produto m/z 197. O composto 10 (t_R =27,48 min) com íon precursor $[M-H]^-$ m/z 295 foi identificado como derivado do danshensu (Zeng *et al.*, 2006).

O composto 20 (t_R = 35,60 min), com íon precursor $[M-H]^-$ m/z 505, apresentou no espectro MS² dois principais íons produtos, m/z 343 e m/z 197, correspondendo respectivamente à perda de um resíduo de glucosídeo (162 Da), seguido

pela perda de um resíduo de ramnosídeo (146 Da), portanto sendo identificado como danshensu-ramnosídeo-glucosídeo (Zeng *et al.*, 2006).

O composto 5 ($t_R = 21,98\text{min} - 22,42\text{ min}$) com íon precursor $[M-H]^-$ m/z 333 foi identificado como ácido (9-oxo-[(3,4 dihidroxifenil) metanoil]-3,4,dihidroxi benzenopropanóico), o seu espectro MS^2 apresentou como pico base o íon m/z 179 e íons fragmento m/z 123, 197, 135 e 153 (Liu *et al.*, 2007^b). De acordo com Guo *et al.* (2015), esse composto foi relatado em *Salvia miltiorrhiza*, e esses íons fragmento correspondem à perda de um ácido protocatecuico (m/z 153) e um danshensu (m/z 197), confirmando que este composto apresenta o danshensu como unidade estrutural.

O ácido rosmarínico ($t_R = 36,78\text{ min}$) com íon precursor $[M-H]^-$ m/z 359 (composto 21) originou íons fragmento m/z 197, m/z 179 $[M-H-180]$, m/z 161 $[M-H-198]$ e m/z 135 (**Figura 6**). A fragmentação m/z 179 confirmou a presença de ácido caféico e m/z 197 indica o derivado 2-hidroxi do ácido hidrocaféico (danshensu), conforme reportado por Nuengchamnong *et al.* (2011).

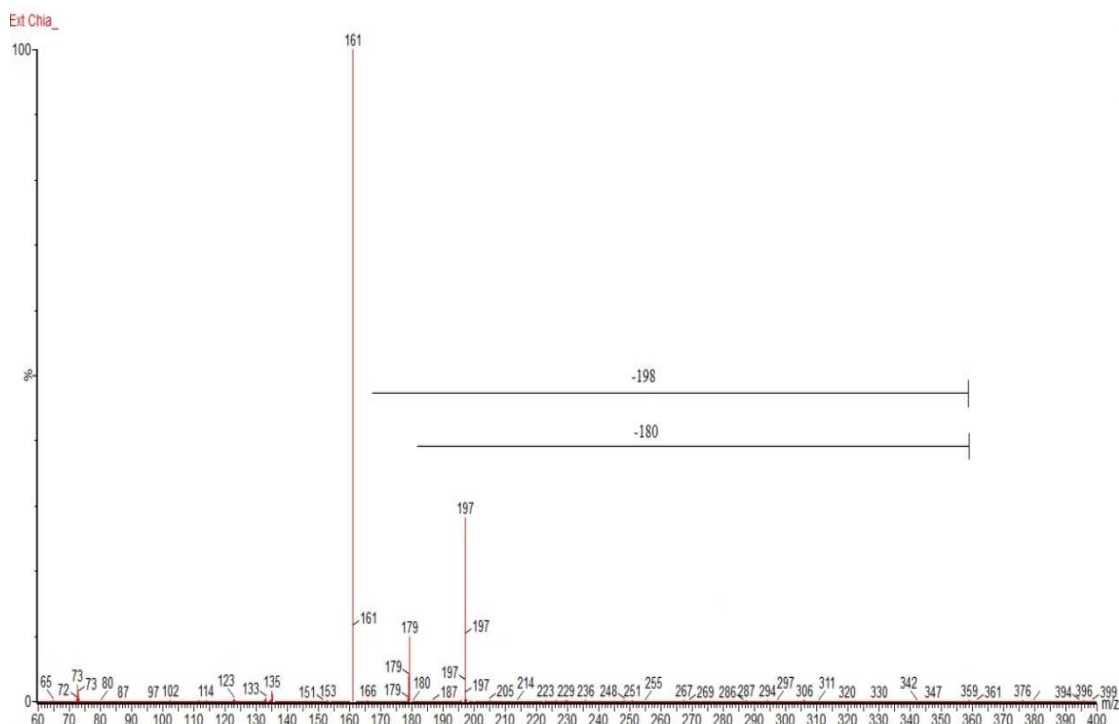


Figura 6. Espectro MS do ácido rosmarínico.

O ácido rosmarínico foi detectado e quantificado como composto majoritário em sementes de chia (Martínez-Cruz & Paredes-López, 2014) e em diferentes espécies de *Salvia* (*Salvia albicaulis*, *Salvia runcinata*, *Salvia muiirii*, *Salvia*

miltiorrhizae, *Salvia officinalis*, *Salvia fruticosa*, *Salvia pomifera*), conforme relatado por Zeng *et al.* (2006), Liu *et al.* (2007^b), Kamatou *et al.* (2008), Hossain *et al.* (2010), Chen *et al.* (2011) e Cvetkovikjet *et al.* (2013).

Guan *et al.* (2014) identificaram o ácido rosmarínico como principal componente em sementes de perilla (*Perilla frutescens* L., família *Lamiaceae*). O ácido rosmarínico tem diversas funções imunorreguladoras, incluindo a atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética (Jayanthi & Subramanian, 2014; Boonyarikpunchai *et al.*, 2014), e efeito protetor da memória (Fonteles *et al.*, 2016).

O ácido rosmarínico-glucosídeo ($t_R=33,58$ min, composto 18) com íon precursor $[M-H]^-$ m/z 521 (**Figura 7**) foi detectado nos extratos e caracterizado pelo íon produto m/z 359 como resultado da perda de um resíduo glucosídeo (162 Da), de acordo com Borrás-Linares *et al.* (2014) e Guan *et al.* (2014). Guan *et al.* (2014) relataram que o ácido rosmarínico-glucosídeo é o segundo principal composto identificado em sementes de perilla (*Perilla frutescens* L., família *Lamiaceae*).

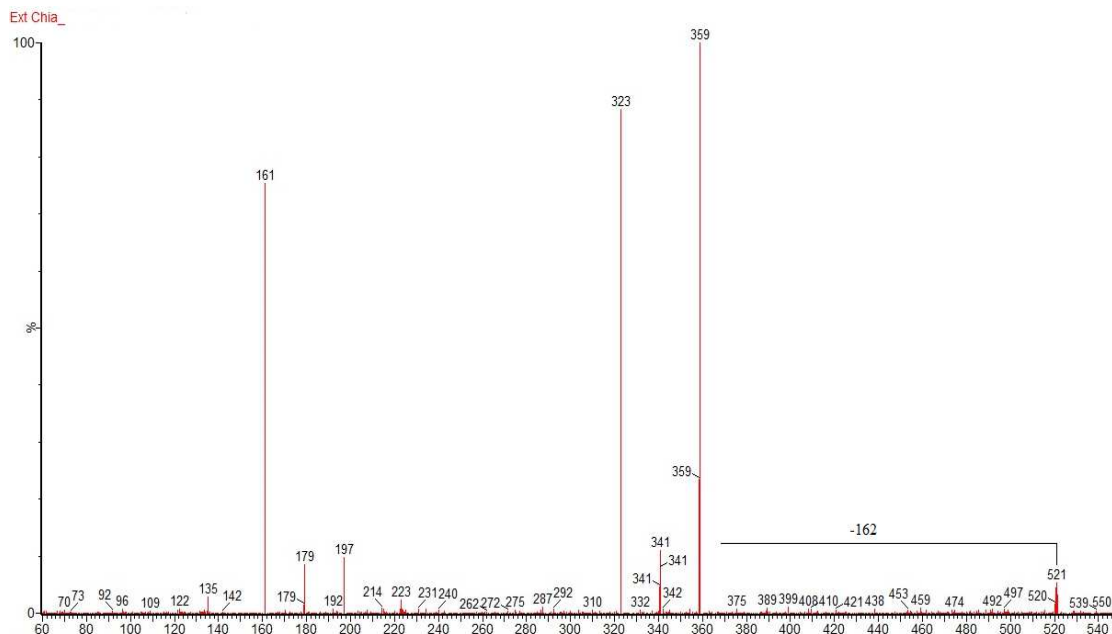


Figura 7. Espectro MS do ácido rosmarínico-glucosídeo.

O ácido metil rosmarínico ($t_R = 42,28$ min - composto 26) foi identificado com íon precursor $[M-H]^-$ m/z 373 e seus íons fragmento m/z 179, 135 e 161 (Zeng *et al.*, 2006; Lecomte *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011). Estudos têm relatado sua presença em *Salvia miltiorrhiza* (Zeng *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2011). Além disso, o ácido metil

rosmarínico-glucosídeo ($t_R=37,97$ min - composto 22) foi determinado com íon precursor $[M-H]^-$ m/z 535, pois seu espectro MS^2 apresentou características da perda de um resíduo glucosídeo (162 Da), gerando o íon m/z 373 como pico base e íon produto m/z 179 (Zeng *et al.*, 2006; Lecomte *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011).

O composto 19 ($t_R = 34,26$ min) com íon $[M-H]^-$ m/z 717 apresentou o íon produto m/z 519 $[M-H-198]^-$ correspondendo a perda de danshensu, bem como o íon produto m/z 339 $[M-H-198-180]^-$ que representa a perda do ácido caféico, e o íon produto m/z 475 $[M-H-198-44]^-$. O composto 19 é um produto da condensação de duas moléculas de ácido rosmarínico por uma ciclização oxidativa (Nuengchamnong *et al.*, 2011). Diferentes compostos, como o ácido salvianólico E, B, L ou ácido isosalvianólico B têm o mesmo peso molecular, mas diferem no seu tempo de eluição, assim comparando o tempo de retenção e o padrão de fragmentação com os dados reportados por Liu *et al.* (2007^b) e Zhang *et al.* (2014), este composto foi identificado como ácido salvianólico E (**Figura 8**).

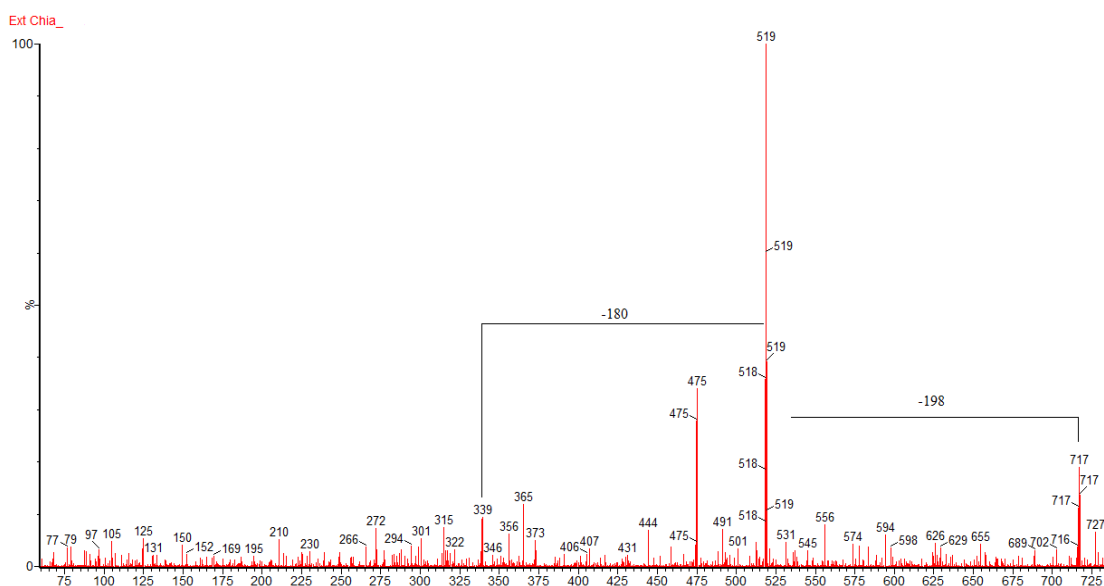


Figura 8. Espectro MS do ácido salvianólico E.

O composto 27 ($t_R = 43,62$ min) exibiu íon precursor $[M-H]^-$ m/z 505 com íons fragmento m/z 311, 293 e 267 sendo identificado como ácido metil salvianólico C (Zeng *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2007). Li *et al.* (2015) relataram efeito protetor renal e atividade anti-inflamatória do ácido salvianólico C. Jiang *et al.* (2008) relataram efeito cardioprotetor através do bloqueio do estresse oxidativo pela ação do ácido salvianólico.

O ácido férulico ($t_R = 39,49$ min) apresentou íon precursor $[M-H]^-$ m/z 193 (composto 23) e íons fragmento m/z 134, 161, 178 e 149 (Sánchez-Rabaneda *et al.*, 2003; Rubió *et al.*, 2012; Becerra-Herrera *et al.*, 2014), sendo que o pico base m/z 134 representa a perda (-59) $[M-H-CO_2-CH_3]^-$ e m/z 161 relata a perda (-32) $[M-H-CH_3OH]^-$, conforme **Figura 9** (Liu *et al.*, 2007^b).

O ácido ferúlico tem sido identificado em sementes de chia (Martínez-Cruz & Paredes-López, 2014), em espécies de *Salvia* (Liu *et al.*, 2007^a, Ruan *et al.*, 2012, Rubió *et al.*, 2012), sendo também predominante em cereais (Wang *et al.*, 2014). O ácido ferúlico tem apresentado em alguns estudos, atividade anticancerígena (Fahrioglu *et al.*, 2016), efeito anti-inflamatório (Doss *et al.*, 2016) e atividade antitrombótica (Hong *et al.*, 2016).

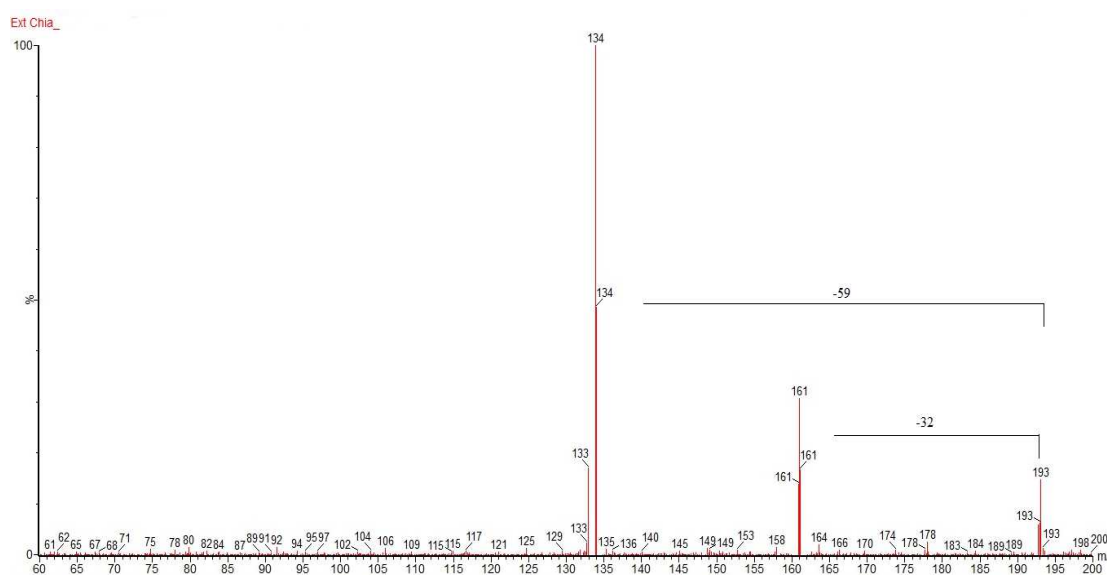


Figura 9. Espectro MS do ácido ferúlico.

O composto com íon precursor $[M-H]^-$ m/z 325 (composto 15) foi identificado como ácido ferúlico-arabinosídeo ($t_R = 30,04$ min), pois o seu espectro MS^2 apresentou a perda de um resíduo de arabinosídeo (132 Da), gerando íon aglicona m/z 193 como pico base, e íons fragmento m/z 134, 149 e 178, característicos do ácido ferúlico (Sánchez-Rabaneda *et al.*, 2003, Becerra-Herrera *et al.*, 2014).

O composto 29 ($t_R = 45,92$ min) com íon precursor $[M-H]^-$ m/z 387 e íons produto m/z 193, 134 e 149 foi identificado como ácido ferúlico truxílico, conforme

reportado por Chandrasekara & Shahidi (2011), correspondendo a perda de um ácido ferúlico [M-H-194], conforme apresentado na **Figura 10**.

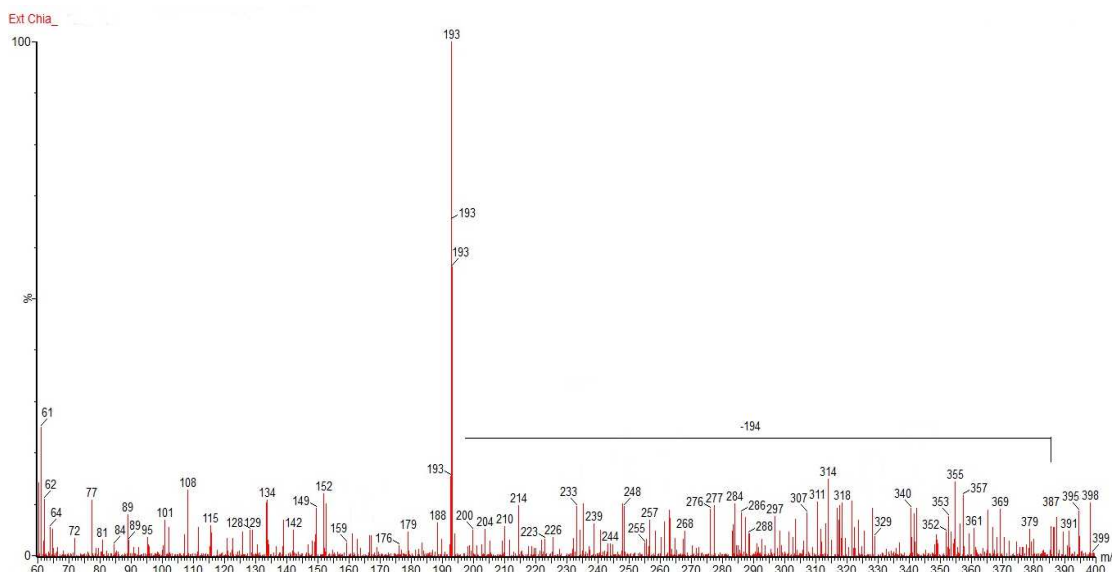


Figura 10. Espectro MS do ácido ferúlico truxílico.

No extrato bruto e hidrolisado da semente, farinha fibrosa e óleo de chia, foi detectado o composto 30 ($t_R = 51,21$ min), que apresentou íon precursor [M-H]⁻ m/z 353 e íon produto m/z 191, sendo identificado como ácido cafeoilquínico, de acordo com Ruan *et al.* (2012).

Nos extratos hidrolisados de óleo de chia, o composto 7 ($t_R = 24,25$ min), com íon precursor [M-H]⁻ m/z 221, e íon produto m/z 119 e pico base m/z 163, foi identificado como derivado do ácido p-cúmarico (Hossain *et al.*, 2010). O ácido p-cumárico-glucosídeo ($t_R = 32,61$ min) foi detectado, exibindo íon precursor [M-H]⁻ m/z 325 (composto 17) e íons produto característicos m/z 163 e m/z 119, apresentando perda de um resíduo glucosídeo (162 Da), tendo o m/z 163 como pico base (Hossain *et al.*, 2010, Rubió *et al.*, 2012).

3.5.4. Ácido hidroxibenzóico e hidroxibenzaldeído

O composto 8 ($t_R = 25,37$ min) foi identificado como o ácido siríngico-glucosídeo, com íon precursor [M-H]⁻ m/z 359 e íon produto m/z 197, correspondente à perda de um resíduo glucosídeo (162 Da), conforme identificado por Parejo *et al.* (2004) e Abu-Reidah *et al.* (2013).

O ácido protocatecuico ($t_R = 29,92$ min) foi identificado com íon precursor $[M-H]^-$ m/z 153 (composto 14) e íons produto m/z 108 e m/z 109, tendo o pico base m/z 109 (Zeng *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2011). O ácido protocatecuico tem sido reportado em espécies de *Salvia* (Liu *et al.*, 2007^b, Chen *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014) e também como um importante ácido fenólico presente no arroz, sorgo, milho, centeio, cevada, aveia e milho (Wang *et al.*, 2014). Nas sementes de chia, o ácido protocatecuico foi quantificado como o segundo composto majoritário por Martínez-Cruz & Paredes-López (2014). O ácido protocatecuico tem sido relatado por sua ação potencial como antioxidante, atividade antibacteriana, anticancerígeno, ação anti-inflamatória, efeito hepatoprotetor e cardioprotetor (Kakkar & Bais, 2014). O protocatecuico aldeído ($t_R = 28,59$ min - composto 11) apresentou íon precursor $[M-H]^-$ m/z 137 e íons produto m/z 108, 136, 92, 109 (Zeng *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007^b).

3.5.5. Terpeno

No extrato bruto do óleo de chia, o composto 31 ($t_R = 61,48$ min) apresentou íon precursor $[M-H]^-$ m/z 329 e íon produto m/z 285 sendo identificado como carnosol, um diterpeno fenólico (Hossain *et al.*, 2010; Cvetkovikj *et al.*, 2013). O terpeno carnosol tem sido reportado como um agente promissor anticancerígeno e anti-inflamatório (Johnson, 2011, Zhang *et al.*, 2012).

3.6 Atividade antioxidante e eletroquímica

O ensaio de determinação do conteúdo fenólico total foi realizado com o reagente Folin Ciocalteu, o qual é atualmente utilizado para comparar a composição fenólica de diferentes amostras, sendo que os resultados obtidos são geralmente correlacionados com dados de ensaios de atividade antioxidante.

A atividade antioxidante pode ser determinada por uma variedade de ensaios com diferentes mecanismos, incluindo a transferência de átomos de hidrogênio (HAT), transferência de elétrons (ET), poder de redução de metais e quelação de metais. O ensaio FRAP é um método que mede o poder de redução de metais, ou seja, mede a habilidade de antioxidantes em reduzir o complexo íon férrico (Fe^{3+}) ao complexo ferroso (Fe^{2+}) de coloração azul intensa em meio ácido (Shahidi & Zhong, 2015).

O ensaio ORAC é um método baseado na transferência de átomos de hidrogênio, e mede a habilidade de um antioxidante contra o radical peroxil, onde o

antioxidante e um marcador fluorescente (fluoresceína) competem cineticamente por radicais peroxil, gerados através da decomposição de compostos nitrogenados, tais como AAPH (2,2'-azobis-(2-metilpropionamida)-dihidroclorado) a 37 °C (Ou *et al.*, 2013). O ORAC é um importante ensaio *in vitro* para avaliar a atividade antioxidante, pois o mesmo utiliza um radical livre biologicamente relevante (radical peroxil) e prevalente na biologia humana. O ensaio ORAC considera tanto o tempo quanto o grau de inibição da liberação da ação do radical livre causada pelos antioxidantes (Ou *et al.*, 2013, Prior, 2015).

Os resultados obtidos para o conteúdo fenólico total (TPC) e a atividade antioxidante medida pelos ensaios ORAC e FRAP nos extratos da semente, farinha fibrosa e óleo de chia são apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Conteúdo fenólico total e atividade antioxidante dos extratos metanólicos da semente, farinha fibrosa e óleo de chia.

Amostras	Extrato bruto*	Extrato hidrolisado*
TPC – Conteúdo Fenólico Total (mg GAE/g)		
Semente	1,16 ± 0,01 ^{bA}	2,23 ± 0,02 ^{aA}
Farinha fibrosa	1,11 ± 0,02 ^{bA}	2,15 ± 0,01 ^{aA}
Óleo	0,02 ± 0,01 ^{bB}	0,07 ± 0,01 ^{aB}
ORAC – Capacidade de Redução do Radical Oxigênio (μmol Trolox equiv/g)		
Semente	131,46 ± 4,49 ^{bA}	143,61 ± 3,93 ^{aA}
Farinha fibrosa	121,32 ± 7,08 ^{bA}	142,92 ± 8,87 ^{aA}
Óleo	6,72 ± 0,59 ^{bB}	10,93 ± 1,04 ^{aB}
FRAP – Poder Antioxidante de Redução do Ferro (μmol Trolox equiv/g)		
Semente	74,08 ± 5,81 ^{bA}	85,42 ± 3,89 ^{aA}
Farinha fibrosa	69,07 ± 3,23 ^{bA}	80,27 ± 7,00 ^{aA}
Óleo	0,26 ± 0,01 ^{bB}	0,77 ± 0,07 ^{aB}

* Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (n=3).

* Médias seguidas de letras diferentes (letras minúsculas) na mesma linha representam diferença estatística significativa (p<0,05) pelo Teste *t*.

* Médias seguidas de letras diferentes (letras maiúsculas) na mesma coluna representam diferença estatística significativa (p<0,05) pelo teste de Tukey.

O valor médio de TPC do extrato bruto da semente está de acordo com os dados já reportados na literatura por Reyes-Caudillo *et al.* (2008), Marineli *et al.* (2014),

Martínez-Cruz & Paredes-López (2014), que descrevem valores entre 0,66 mg GAE/g e 1,63 mg GAE/g. As sementes de chia geralmente são consumidas em conjunto com cereais na dieta humana, por isso é interessante comparar os resultados obtidos neste estudo com os conteúdos de compostos fenólicos relatados para alguns cereais.

Os TPC dos extratos de semente e farinha fibrosa de chia foram similares, porém os extratos do óleo, os seus valores médios de TPC foram extremamente baixos. O perfil cromatográfico obtidos a 280 nm (**Figura 1**) confirma que a composição química de ambos extratos, semente e farinha fibrosa, são similares. Para o extrato do óleo, alguns compostos comuns foram detectados, mas conforme a característica da amostra, são mais dominantes no cromatograma os compostos lipofílicos, os quais eluem no maior tempo de retenção (35-60 min).

A semente de chia possui valor superior de TPC em comparação com alguns cereais, tais como cevada (*Hordeum vulgare* – 0,37mg GAE/g), aveia (*Avena sativa* – 0,39mg GAE/g), arroz (*Oryza sativa* – 0,24mg GAE/g) e milho (*Zea mays* – 0,15mg GAE/g) (Irakli *et al.*, 2012).

O extrato bruto da semente apresentou uma atividade antioxidante menor do que reportado por Marineli *et al.* (2014), que determinaram pelo ensaio ORAC o valor de 514,30 $\mu\text{mol TE/g}$ e para FRAP o valor de 405,71 $\mu\text{mol TE/g}$. As diferenças obtidas são certamente devido às características das amostras, especialmente porque existem muitos fatores que podem causar essas variações, tais como região de cultivo da planta e condições climáticas. Os compostos fenólicos são em geral substâncias de defesa, sendo que a sua quantidade nas plantas e sementes podem variar em resposta aos efeitos adversos do meio ambiente, condições climáticas e disponibilidade de nutrientes no solo (Porrás-Loaiza *et al.*, 2014).

Reyes-Caudillo *et al.* (2008) relataram que a hidrólise ácida não aumentou o TPC em relação ao extrato bruto das sementes de chia, quando o procedimento de hidrólise foi aplicado durante o processo de extração, porém os fatores climáticos, tipo de solo e região de cultivo podem explicar essas variações. Além disso, o procedimento de hidrólise ácida utilizado é semelhante ao método realizado para hidrolisar polissacarídeos na análise química de carboidratos em frutas e cereais, a qual permite romper as ligações glicosídicas e liberar fenóis ligados.

Os TPC dos extratos (**Tabela 7**) mostram que existem diferenças entre amostras brutas e hidrolisadas, que podem ser explicadas por diferenças na composição química observada no perfil cromatográfico (**Figura 1 e Figura 2**). Ambos os perfis,

extrato bruto e hidrolisado, são amostras complexas, pois um elevado número de compostos foi detectado em diferentes concentrações. Observa-se no perfil cromatográfico a prevalência de compostos menos hidrofílicos nas amostras hidrolisadas devido à perda de açúcar em condições ácidas.

Considerando a área total dos picos, cerca de 65 % da área total detectada a 280 nm corresponde aos compostos 18 (ácido rosmarínico glicosídeo) e 21 (ácido rosmarínico) nos extratos brutos de semente e farinha fibrosa. Após hidrólise, a concentração destes compostos diminui para 15 % da área total do cromatograma, e os picos 5 e 6, que correspondem ao ácido 9-oxo-[(3,4-dihidroxifenil) metanoil]-3,4-dihidroxibenzenopropanóico e danshensu, são cerca de 55 % da área total do pico (**Figura 2**). O extrato hidrolisado também apresentou um aumento no teor do ácido metil rosmarínico, mas isto pode ter ocorrido devido à uma reação de metilação, uma vez que o extrato é rico em metanol. Embora estas diferenças tenham sido observadas na composição, os resultados da atividade antioxidante (**Tabela 7**) mostram que para os extratos hidrolisados o valor é superior significativamente ao dos extratos brutos. A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos depende do número de grupos hidroxilas na molécula, o qual pode ser reforçado pelo impedimento estérico (Rice-Evans *et al.*, 1996; Dobes *et al.*, 2013).

A discussão desses resultados pode ser complementada com a informação obtida a partir do detector eletroquímico. Este tipo de detector é muito sensível e pode fornecer algumas informações sobre os compostos com propriedades eletroquímicas (Dobes *et al.*, 2013). A detecção eletroquímica (DE) avalia o poder redutor total dos compostos antioxidantes presentes nas amostras, sem o uso de espécies reativas, portanto pode ser considerado como um teste direto da capacidade antioxidante total, uma vez que se baseia apenas nas propriedades físico-químicas dos compostos antioxidantes (Blasco *et al.*, 2007). Além disso, o comportamento eletroquímico dos compostos fenólicos depende de suas características estruturais (Cosio *et al.*, 2006).

O perfil cromatográfico apresentado na **Figura 11** mostra os compostos eletroquimicamente ativos detectados nas amostras, tais como o ácido caféico, danshensu, ácido rosmarínico e ácido ferúlico, entre outros. O ácido férulico e o acetato de hidroxitirosol foram detectados apenas no extratos hidrolisados da semente e farinha de chia, e podem ser responsáveis pelo aumento da atividade antioxidante determinada nos mesmos. O detector eletroquímico acoplado com HPLC permite avaliar o poder antioxidante de compostos específicos. Cosio *et al.* (2006) estudaram a atividade

eletroquímica do ácido caféico, ácido rosmarínico e ácido ferúlico, com o objetivo de determinar a atividade antioxidante em extratos de ervas da família *Lamiaceae*, e obtiveram maior poder antioxidante no alecrim e sálvia devido ao alto teor de ácido rosmarínico e seus derivados.

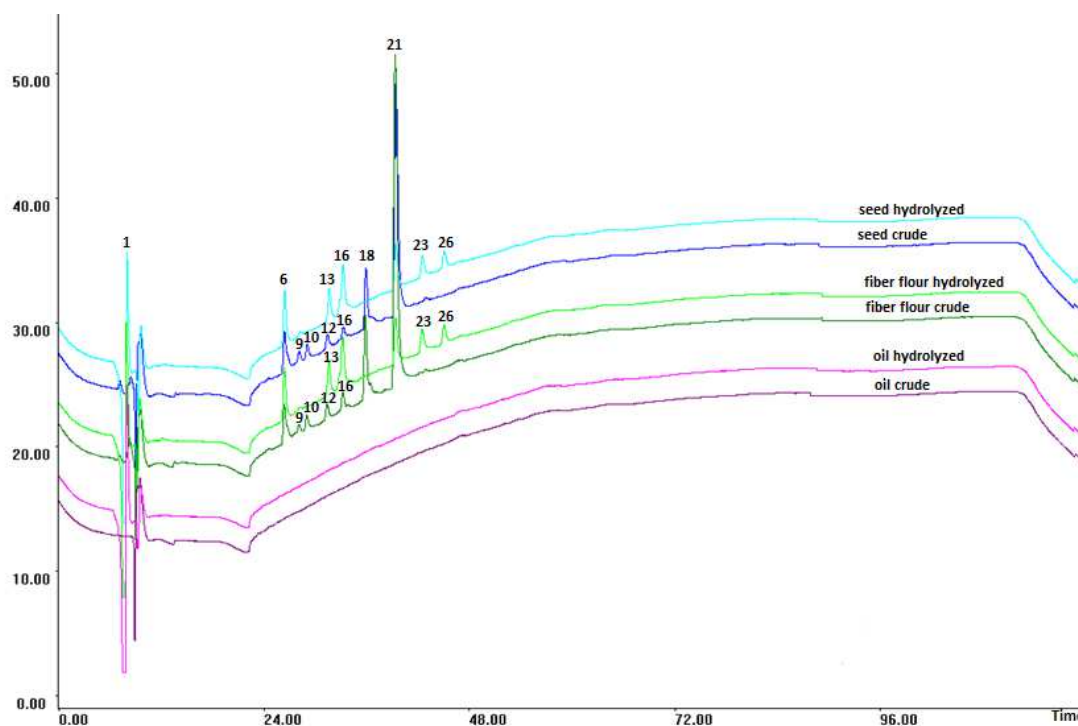


Figura 11. Perfil dos extratos da semente, farinha fibrosa e óleo de chia obtidos por HPLC-DAD-ED.

Muitos estudos têm investigado as propriedades antioxidantes e efeitos biológicos dos ácidos fenólicos, mas estudos de biodisponibilidade são necessários para compreender o impacto real desses compostos na saúde humana. Sabe-se que os ácidos fenólicos são os principais compostos fenólicos consumidos, com uma ingestão média de 200 mg/dia, dependendo dos hábitos alimentares (Clifford & Scalbert, 2000; Heleno *et al.*, 2015). Após a ingestão, o ácido fenólico livre e o ácido fenólico conjugado são rapidamente absorvidos no estômago e no intestino delgado, ficando assim prontamente disponíveis para serem metabolizados no corpo humano como glucuronídeo, derivados metilados e sulfatados (Heleno *et al.*, 2015). Para moléculas mais complexas, o processo de absorção pode não ocorrer, mas a microbiota intestinal pode atuar tornando

essas moléculas biodisponíveis para exercer seus benefícios para a saúde (Acosta-Estrada *et al.*, 2014).

4. CONCLUSÃO

As condições experimentais utilizadas no trabalho permitiram a caracterização química e a identificação dos compostos fenólicos nos extratos metanólicos da semente, farinha fibrosa e óleo de chia, com base no tempo de retenção, nos espectros UV e no padrão de fragmentação dos espectros MS/MS.

A semente de chia apresenta alto teor de proteínas, lipídeos e fibra alimentar. Os principais ácidos graxos identificados na semente, farinha fibrosa e óleo foram o ácido oléico, linoléico e linolênico. Os minerais predominantes na semente e farinha de chia são o cálcio, magnésio, potássio e ferro.

Os teores de fenólicos totais foram maiores no extrato hidrolisado, $2,23 \pm 0,02$ mg GAE g⁻¹ do que no extrato bruto da semente de chia, $1,16 \pm 0,01$ mg GAE g⁻¹. Os resultados da atividade antioxidantes pelo ensaio FRAP e ORAC dos extratos hidrolisados da semente, farinha e óleo de chia foram significativamente maiores do que nos extratos brutos.

Em resumo, foram identificados 14 derivados de ácidos fenólicos nos extratos brutos e 21 derivados de ácidos fenólicos nos extratos hidrolisados, sendo majoritários, o ácido caféico, danshensu, ácido rosmarínico, ácido metil rosmarínico, ácido salvianólico C e ácido salvianólico E. Alguns destes compostos são eletroquimicamente ativos sob as condições de análise e podem estar relacionados com a atividade antioxidante dos extratos. O procedimento de hidrólise ácida permitiu identificar maior número de ácidos fenólicos na semente e farinha de chia. Os resultados obtidos com extratos hidrolisados podem indicar que após o consumo de semente de chia e dos seus produtos durante o processo de digestão podem ocorrer um aumento na atividade antioxidante, embora um modelo de digestão deve ser usado para confirmar essa hipótese.

O consumo de semente de chia pode ser uma alternativa importante como fonte de ácidos fenólicos, sugerindo o seu uso como alimento funcional na ingestão diária. Portanto, estes resultados fornecem novas informações sobre os principais ácidos fenólicos presentes em chia, que são importantes antioxidantes naturais para a prevenção de doenças causadas por estresse oxidativo.

5. REFERÊNCIAS

- Abu-Reidah, I. M., Contreras, M. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Reversed-phase ultra-high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization–quadrupole–time-of-flight mass spectrometry as a powerful tool for metabolic profiling of vegetables: *Lactuca sativa* as an example of its application. *J Chromatogr A*, 1313, 212–227.
- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46–55.
- Adams, C. A. (1999). Oxidations and antioxidants. In: *Nutricines. Food components in Health and Nutrition. Nottingham Univ. Press., Chapter 2*, 11–34.
- Akoh, C. C., & Min, D. B. (2008). Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology. *CRC Press, Third edition*, 393–394.
- AMC. (1987). Analytical Methods Committee. Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit. *Analyst*, 112, 199–204.
- AOAC. (2006). Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th. Gaithersburg. *AOAC International*.
- AOCS. (2009). Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. *AOCS: Champaign*.
- Atwater, W. O., & Bryant, A. P. (1900). 12th Annual Report of the Storrs. *CT Agricultural Experimental Station, University of Connecticut, Storrs*, 73-110.
- Ayerza, R. (2013). Seed composition of two chia (*Salvia hispanica* L.) genotypes which differ in seed color. *Emir. J. Food Agric.*, 25(7), 495–500.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2004). Composition of chia (*Salvia hispanica*) grown in six tropical and subtropical ecosystems of South America. *Trop. Sci.*, 44, 131–135.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2007). Effect of dietary α -linolenic fatty acid derived from chia when fed as ground seed, whole seed and oil on lipid content and fatty acid composition of rat plasma. *An. of Nutr. Metabolism*, 51, 27–34.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2009). Influence of environment on growing period and yield, protein, oil and α -linolenic content of three chia (*Salvia hispanica* L.) selections. *Ind. Cr. and Products*, 30, 321–324.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2011). Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Ind. Cr. and Products*, 34, 1366–1371.
- Bajoub, A., Pacchiarotta, T., Hurtado-Fernández, E., Olmo-García, L., García-Villalba, R., Fernández-Gutiérrez, A., Mayboroda, O. A., & Carrasco-Pancorbo, A. (2016). Comparing two metabolic profiling approaches (liquid chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometry) for extra-virgin olive oil phenolic compounds analysis: a botanical classification perspective. *J. of Chromatography A*, 1428, 267–279.
- Ballus, C. A., Quirantes-Piné, R., Bakhouch, A., Silva, L. F. O., Oliveira, A. F., Coutinho, E. F., Croce, D. M., Segura-Carretero, A., & Godoy, H. T. (2015). Profile of phenolic compounds of Brazilian virgin olive oils by rapid resolution liquid chromatography coupled to electrospray ionisation time-of-flight mass spectrometry (RRLC–ESI–TOF–MS). *F. Chemistry*, 170, 366–377.
- Becerra-Herrera, M., Sánchez-Astudillo, M., Beltrán, R., & Sayago, A. (2014). Determination of phenolic compounds in olive oil: new method based on liquid-liquid micro extraction and ultra high performance liquid chromatography–triple-quadrupole mass spectrometry. *F. Sci. and Technology*, 57, 49–57.

- Beljkaš, B., Matić, J., Milovanović, I., Jovanov, P., Mišan, A., & Šarić, L. (2010). Rapid method for determination of protein content in cereals and oilseeds: validation, measurement uncertainty and comparison with the Kjeldahl method. *Accred. and Qual. Assurance*, 15(10), 555–561.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochemistry*, 239(1), 70–76.
- Blasco, A. J., Crevillén, A. G., González, M. C., & Escarpa, A. (2007). Direct electrochemical sensing and detection of natural antioxidants and antioxidant capacity in vitro systems. *Electroanalysis*, 19 (22), 2275–2286.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *J Biochem Physiol*, 37(8), 911–917.
- Bodoira, R. M., Penci, M. C., Ribotta, P. D., & Martínez, M. L. (2017). Chia (*Salvia hispanica* L.) oil stability: study of the effect of natural antioxidants. *F. Sci. and Technology*, 75, 107–113.
- Boonyarikpunchai, W., Sukrong, S., & Towiwat, P. (2014). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl. *Pharm., Bioch. and Behavior.*, 124, 67–73.
- Borrás-Linares, I., Stojanović, Z., Quirantes-Piné, R., Arráez-Román, D., Švarc-Gajić, J., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2014). *Rosmarinus officinalis* leaves as a natural source of bioactive compounds. *Int. J. Molec. Sciences*, 15, 20585–20606.
- Borrás Linares, I., Arráez-Román, D., Herrero, M., Ibáñez, E., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2011). Comparison of different extraction procedures for the comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in *Rosmarinus officinalis* by reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. *J. of Chromatography A*, 1218, 7682–7690.
- BRASIL - ANVISA (1978). Resolução - CNNPA nº 12, Padrões de identidade e qualidade para os alimentos e bebidas. *Diário Ofic. da Rep. Fed. do Brasil*.
- BRASIL - ANVISA (2003). RDC 360 - Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. *Diário Ofic. da Rep. Fed. do Brasil*.
- Bravo, M. N., Silva, S., Coelho, A. V., Vilas Boas, L., & Bronze, M. R. (2006). Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. *Anal. Chimica Acta*, 563, 84–92.
- Brownlee, I. A., Chater, P. I., Pearson, J. P., & Wilcox, M. D. (2016). Dietary fibre and weight loss: where are we now? *F. Hydrocolloids*, 1–6.
- Buchholz, A. C., & Schoeller, D. A. (2004). Is a calorie a calorie? *Am J Clin. Nutrition*, 79 (suppl), 899S–906S.
- Bushway, A. A., Belyea, P. R., & Bushway, R. J. (1981). Chia seed as a source of oil, polysaccharide, and protein. *J. of F. Science*, 46, 1349–1356.
- Busilacchi, H., Quiroga, M., Bueno, M., Di Sapio, O., Flores, V., & Severin, C. (2013). Evaluation of *Salvia hispanica* L. cultivated in the south of Santa Fe (Argentina). *Cult. Tropicales*, 34(4), 55–59.
- Cahiil, J. P. (2003). Ethnobotany of chia, *Salvia hispanica* L. (*Lamiaceae*). *Econ. Botany*, 57(4), 604–618.
- Capitani, M. I., Spotorno, V., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2012). Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *F. Sci. and Technology*, 45, 94–102.

- Carvalho, L. M. J., Gomes, P. B., Godoy, R. L. O., Pacheco, S., Monte, P. H. F., Carvalho, J. L. V., Nutti, M. R., Neves, A. C. L., Vieira, A. C. R. A., Ramos, S. R. R. (2012). Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): a preliminary study. *F. Res. International*, 47, 337–340.
- Cazarin, C. B. B., da Silva, J. K., Colomeu, T. C., Batista, A. G., Meletti, L. M. M., Paschoal, J. A. R., Bogusz, S., Braga, P. A. D., Reyes, F. G. R., Augusto, F., de Meirelles, L. R., Zollner, R. D., & Marostica, M. R. (2015). Intake of *Passiflora edulis* leaf extract improves antioxidant and anti-inflammatory status in rats with 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid induced colitis. *J. of Fun. Foods*, 17, 575–586.
- Chandrasekara, A., & Shahidi, F. (2011). Determination of antioxidant activity in free and hydrolyzed fractions of millet grains and characterization of their phenolic profiles by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. *J. of Fun. Foods*, 3, 144–158.
- Chang, W. C., Kuo, P. L., Chen, C. W., Wu, J. S. B., & Shen, S. C. (2015). Caffeic acid improves memory impairment and brain glucose metabolism via ameliorating cerebral insulin and leptin signaling pathways in high-fat diet-induced hyperinsulinemic rats. *F. Res. Internacional*, 77, 24–33.
- Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S. S., & Webb, C. (2002). Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *Intern. J. of Food Microbiology*, 79, 131–141.
- Chen, H., Zhang, Q., Wang, X., Yang, J., & Wang, Q. (2011). Qualitative analysis and simultaneous quantification of phenolic compounds in the aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* by HPLC-DAD and ESI/MSⁿ. *Phytoch. Analysis*, 22, 247–257.
- Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 5, 179–186.
- Chong, C.-M., Zhou, Z.-Y., Razmovski-Naumovski, V., Cui, G.-Z., Zhang, L.-Q., Sa, F., Hoi, P.-M., Chan, K., & Lee, S. M.-Y. (2013). Danshensu protects against 6-hydroxydopamine-induced damage of PC12 cells in vitro and dopaminergic neurons in zebrafish. *Neur. Letters*, 543, 121–125.
- Choo, W.-S., Birch, J., & Dufour, J.-P. (2007). Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed flaxseed oils. *J. of F. Comp. and Analysis*, 20, 202–211.
- Ciftci, O. N., Przybylski, R., & Rudzinska, M. (2012). Lipid components of flax, perilla, and chia seeds. *Eur. J. Lip. Sci. Technology*, 114, 794–800.
- Clifford, M. N., & Scalbert, A. (2000). Ellagitannins-occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *J. of the Sci. of Food and Agriculture*, 80, 1118–1125.
- Coates, W., & Ayerza, R. (1996). Production potential of chia in northwestern Argentina. *Ind. Cr. and Products*, 5, 229–233.
- CODEX – Commission, C. A. (2001). Codex standard for edible fats and oils not covered by individual standards. *Secretariat of the Joint FAO/WHO Food Standards Programme, FAO, Rome*, 8, 28.
- Coelho, V. R., Vieira, C. G., Souza, L. P., Moysés, F., Basso, C., Papke, D. K. M., Pires, T. R., Siqueira, I. R., Picada, J. N., & Pereira, P. (2015). Antiepileptogenic, antioxidant and genotoxic evaluation of rosmarinic acid and its metabolite caffeic acid in mice. *Lif. Sciences*, 122, 65–71.
- Coorey, R., Tjoe, A., & Jayasena, V. (2014). Gelling properties of chia seed and flour. *J. of F. Science*, 79(5), 859–866.

- Cosio, M. S., Buratti, S., Mannino, S., & Benedetti, S. (2006). Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the *Labiatae* family. *F. Chemistry*, 97, 725–731.
- Croft, K. D. (2016). Dietary polyphenols: antioxidants or not. *Arch. of Biochemistry and Biophysics*, 595, 120–124.
- Cvetkovikj, I., Stefkov, G., Acevska, J., Petreska Stanoeva, J., Karapandzova, M., Stefova, M., Dimitrovska, A., & Kulevanova, S. (2013). Polyphenolic characterization and chromatographic methods for fast assessment of culinary *Salvia* species from South East Europe. *J. of Chromatography A*, 1282, 38–45.
- Das, U. N. (2006). Essential fatty acids - a review. *Cur. Pharm. Biotechnology*, 7, 467–482.
- Dobes, J., Zitka, O., Sochor, J., Ruttkay-Nedecky, B., Babula, P., Beklova, M., Kynicky, J., Hubalek, J., Klejdus, B., Kizek, R., & Adam, V. (2013). Electrochemical tools for determination of phenolic compounds in plants: a review. *Int. J. Electroch. Science*, 8, 4520–4542.
- Doss, H. M., Dey, C., Sudandiradoss, C., & Rasool, M. K. (2016). Targeting inflammatory mediators with ferulic acid, a dietary polyphenol, for the suppression of monosodium urate crystal-induced inflammation in rats. *Lif. Sciences*, 148, 201–210.
- DRI - Dietary Reference Intake (1997). Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride. *Institute of Medicine*, Washington (DC): National Academy Press.
- DRI - Dietary Reference Intake (2001). Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *Institute of Medicine*, Washington (DC): National Academy Press.
- DRI - Dietary Reference Intake (2005). Dietary reference intakes for water, potassium, sodium, chloride and sulfate. *Institute of Medicine*, Washington (DC): National Academy Press.
- Esposito, K., Marfella, R., Ciotola, M., Di Palo, C., Giugliano, F., Giugliano, G., D'Armiento, M., D'Andrea, F., & Giugliano, D. (2004). Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *J. of the Amer. Med. Association*, 292(12), 1440–1446.
- Fahrioglu, U., Dodurga, Y., Elmas, L., & Seçme, M. (2016). Ferulic acid decreases cell viability and colony formation while inhibiting migration of MIA PaCa-2 human pancreatic cancer cells *in vitro*. *Gene*, 576, 476–482.
- Fonteles, A. A., Souza, C. M., Neves, J. C. S., Menezes, A. P. F., Carmo, M. R. S., Fernandes, F. D. P., Araújo, P. R., & Andrade, G. M. (2016). Rosmarinic acid prevents against memory deficits in ischemic mice. *Behav. Brain Research*, 297, 91–103.
- Gómez-Romero, M., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. *Phytochemistry*, 71, 1848–1864.
- Graham, R. D., Welch, R. M., Saunders, D. A., Ortiz-Monasterio, I., Bouis, H. E., Bonierbale, M., de Haan, S., Burgos, G., Thiele, G., Liria, R., Meisner, C. A., Beebe, S. E., Potts, M. J., Kadian, M., Hobbs, P. R., Gupta, R., Twomlow, S. (2007). Nutritious subsistence food systems. *Adv. in Agronomy*, 92, 1–74.
- Guan, Z., Li, S., Lin, Z., Yang, R., Zhao, Y., Liu, J., Yang, S., & Chen, A. (2014). Identification and quantitation of phenolic compounds from the seed and

- pomace of *Perilla frutescens* using HPLC/PDA and HPLC–ESI/QTOF/MS/MS. *Phytochem. Anal.*, 25(6), 508–513.
- Guinazi, M., Milagres, R. C. R. M., Pinheiro-Sant’Ana, H. M., & Chaves, J. B. P. (2009). Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. *Quim. Nova*, 32(8), 2098–2103.
- Guo, D., Zhang, J., Zhu, M., Fan, X., Wu, Y., Liu, A., Yang, M., & Qu, H. (2015). Fingerprint Study. In X. Yan (Ed.), *Dan Shen (Salvia miltiorrhiza) in Medicine*, vol. 2, pp. 357–458: Springer.
- Harris Jackson, K., West, S. G., Vanden Heuvel, J. P., Jonnalagadda, S. S., Ross, A. B., Hill, A. M., Grieger, J. A., Lemieux, S. K., & Kris-Etherton, P. M. (2014). Effects of whole and refined grains in a weight-loss diet on markers of metabolic syndrome in individuals with increased waist circumference: a randomized controlled-feeding trial. *Am. J. Clin. Nutrition*, 100, 577–586.
- Hartmann, L., & Lago, R. C. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Practices*, 22(8), 475–476.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds, a review. *F. Chemistry*, 173, 501–513.
- Herrera, M. C., & Luque de Castro, M. D. (2004). Ultrasound-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries. *Anal. Bioana. Chemistry*, 379, 1106–1112.
- Ho, H., Lee, A. S., Jovanovski, E., Jenkins, A. L., DeSouza, R., & Vuksan, V. (2013). Effect of whole and ground Salba seeds (*Salvia hispanica* L.) on postprandial glycemia in healthy volunteers: a randomized controlled, dose-response trial. *Europ. J. of Clin. Nutrition*, 67, 786–788.
- Hong, Q., Ma, Z.-C., Huang, H., Wang, Y.-G., Tan, H.-L., Xiao, C.-R., Liang, Q.-D., Zhang, H.-T., & Gao, Y. (2016). Antithrombotic activities of ferulic acid via intracellular cyclic nucleotide signaling. *Europ. J. of Pharmacology*, 777, 1–8.
- Hossain, M. B., Raib, D. K., Brunton, N. P., Martin-Diana, A. B., & Barry-Ryan, C. (2010). Characterization of phenolics composition in *Lamiaceae* spices by LC-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chemistry*, 58(19), 10576–10581.
- Irakli, M. N., Samanidou, V. F., Biliaderis, C. G., & Papadoyannis, I. N. (2012). Development and validation of an HPLC-method for determination of free and bound phenolic acids in cereals after solid-phase extraction. *F. Chemistry*, 134, 1624–1632.
- Ixtaina, V. Y., Julio, L. M., Wagner, J. R., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2015). Physicochemical characterization and stability of chia oil microencapsulated with sodium caseinate and lactose by spray-drying. *Pow. Technology*, 271, 26–34.
- Ixtaina, V. Y., Martínez, M. L., Spotorno, V., Mateo, C. M., Maestri, D. M., Diehl, B. W. K., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2011). Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *J. of F. Comp. and Analysis*, 24, 166–174.
- Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2012). Oxidative stability of chia (*Salvia hispanica* L.) seed oil: effect of antioxidants and storage conditions. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 89, 1077–1090.
- Jayanthi, G., & Subramanian, S. (2014). Rosmarinic acid, a polyphenol, ameliorates hyperglycemia by regulating the key enzymes of carbohydrate metabolism in high fat diet – STZ induced experimental *diabetes mellitus*. *Biomedicine and Prevent. Nutrition*, 4(3), 431–437.

- Jiang, B., Zhang, L., Li, M., Wu, W., Yang, M., Wang, J., & Guo, D. (2008). Salvianolic acids prevent acute doxorubicin cardiotoxicity in mice through suppression of oxidative stress. *F. and Chem. Toxicology*, 46, 1510–1515.
- Johnson, J. J. (2011). Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. *Canc. Lett.*, 305(1), 1–7.
- Jorge, N. (2009). Química e tecnologia de óleos vegetais. *Universidade Estadual Paulista, São Paulo*.
- Kakkar, S., & Bais, S. (2014). A Review on protocatechuic acid and its pharmacological potential. *ISRN Pharmacology*, 1–9.
- Kamatou, G. P. P., Makunga, N. P., Ramogola, W. P. N., & Viljoen, A. M. (2008). South African *Salvia* species: a review of biological activities and phytochemistry. *J. of Ethnopharmacology*, 119, 664–672.
- Kamatou, G. P. P., Viljoen, A. M., Gono-Bwalya, A. B., van Zyl, R. L., van Vuuren, S. F., Lourens, A. C. U., Baser, K. H. C., Demirci, B., Lindsey, K. L., van Staden, J., & Steenkamp, P. (2005). The in vitro pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species. *J. of Ethnopharmacology*, 102, 382–390.
- Kontogianni, V. G., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A. A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S., Stojanovic, I., Gerothanassis, I. P., & Tzakos, A. G. (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *F. Chemistry*, 136, 120–129.
- Kwon, G., Kim, H. J., Park, S. J., Lee, H. E., Woo, H., Ahn, Y. J., Gao, Q., Cheong, J. H., Jang, D. S., & Ryu, J. H. (2014). Anxiolytic-like effect of danshensu [(3-(3,4-dihydroxyphenyl)-lactic acid)] in mice. *Lif. Sciences*, 101, 73–78.
- Lafay, S., & Gil-Izquierdo, A. (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem*, 7, 301–311.
- Lecomte, J., Giraldo, L. J. L., Laguerre, M., Baréa, B., & Villeneuve, P. (2010). Synthesis, characterization and free radical scavenging properties of rosmarinic acid fatty esters. *J. Am. Oil Chem Soc*, 87, 615–620.
- Li, J., Gu, T., Fu, X., & Zhao, R. (2015). Effect of salvianolic acid A and C compatibility on inflammatory cytokines in rats with unilateral ureteral obstruction. *J Tradit Chin. Medicine*, 35(5), 564–570.
- Liu, A.-H.^b, Guo, H., Ye, M., Lin, Y.-H., Sun, J.-H., Xu, M., & Guo, D.-A. (2007). Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *J. of Chromatography A*, 1161, 170–182.
- Liu, M.^a, Li, Y.-G., Zhang, F., Yang, L., Chou, G.-X., Wang, Z.-T., & Hu, Z.-B. (2007). Chromatographic fingerprinting analysis of Danshen root (*Salvia miltiorrhiza* Radix et Rhizoma) and its preparations using high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray mass spectrometry (HPLC-DADESI/MS). *J. Sep. Sci.*, 30, 2256–2267.
- Marineli, R. S., Lenquiste, S. A., Moraes, E. A., & Maróstica Jr., M. R. (2015). Antioxidant potential of dietary chia seed and oil (*Salvia hispanica* L.) in diet-induced obese rats. *F. Res. International*, 76, 666–674.
- Marineli, R. S., Moraes, E. A., Lenquiste, S. A., Godoy, A. T., Eberlin, M. N., & Maróstica Jr., M. R. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *F. Sci. and Technology*, 59, 1304–1310.

- Martínez-Cruz, O., & Paredes-López, O. (2014). Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) by ultra high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1346, 43–48.
- Martínez, M. L., Curti, M. I., Roccia, P., Llabot, J. M., Penci, M. C., Bodoira, R. M., & Ribotta, P. D. (2015). Oxidative stability of walnut (*Juglans regia* L.) and chia (*Salvia hispanica* L.) oils microencapsulated by spray drying. *Pow. Technology*, 270, 271–277.
- Martínez, M. L., Marín, M. A., Faller, C. M. S., Revol, J., Penci, M. C., & Ribotta, P. D. (2012). Chia (*Salvia hispanica* L.) oil extraction: study of processing parameters. *F. Sci. and Technology*, 47, 78–82.
- Mohd Ali, N., Yeap, S. K., Ho, W. Y., Beh, B. K., Tan, S. W., & Tan, S. G. (2012). The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. *J. of Biom. and Biotechnology*, 2012, 1–9.
- Moretto, E., & Fett, R. (1998). Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos. *São Paulo: Varela*, 150.
- Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., & Scaccini, C. (2002). Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J. of Agric. and F. Chemistry*, 50, 5735–5741.
- Nasr Bouzaiene, N., Jaziri, S. K., Kovacic, H., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., & Luis, J. (2015). The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. *Eur. J. of Pharmacology*, 766, 99–105.
- Ndolo, V. U., & Beta, T. (2013). Distribution of carotenoids in endosperm, germ, and aleurone fractions of cereal grain kernels. *F. Chemistry*, 139, 663–671.
- Nuengchamnong, N., Krittasilp, K., & Ingkaninan, K. (2011). Characterisation of phenolic antioxidants in aqueous extract of *Orthosiphon grandiflorus* tea by LC–ESI-MS/MS coupled to DPPH assay. *F. Chemistry*, 127, 1287–1293.
- Ou, B., Chang, T., Huang, D., & Prior, R. L. (2013). Determination of total antioxidant capacity by oxygen radical 563 absorbance capacity (ORAC) using fluorescein as the fluorescence probe: first action 2012.23. *J. of 564 AOAC Inter.*, 96(6), 1372–1376.
- Parejo, I., Caprai, E., Bastida, J., Viladomat, F., Jáuregui, O., & Codina, C. (2004). Investigation of *Lepechinia graveolens* for its antioxidant activity and phenolic composition. *J. of Ethnopharmacology*, 94, 175–184.
- Peiretti, P. G., & Gai, F. (2009). Fatty acid and nutritive quality of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds and plant during growth. *An. F. Sci. and Technology*, 148, 267–275.
- Pizarro, M. L., Becerra, M., Sayago, A., Beltrán, M., & Beltrán, R. (2013). Comparison of different extraction methods to determine phenolic compounds in virgin olive oil. *Food Anal. Methods*, 6, 123–132.
- Porras-Loaiza, P., Jiménez-Munguía, M. T., Sosa-Morales, M. E., Palou, E., & Lopez-Malo, A. (2014). Physical properties, chemical characterization and fatty acid composition of Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Inter. J. of F. Sci. and Technology*, 49, 571–577.
- Poudyal, H., Panchal, S. K., Waanders, J., Ward, L., & Brown, L. (2012). Lipid redistribution by α -linolenic acid-rich chia seed inhibits stearyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. *J. of Nutr. Biochemistry*, 23, 153–162.

- Pradhananga, S., & Shim, W. S. (2015). Caffeic acid exhibits anti-pruritic effects by inhibition of multiple itch transmission pathways in mice. *Eur. J. of Pharmacology*, 762, 313–321.
- Prado, M. A., Lizama, M., Pena, A., Valenzuela, C., & Viviani, T. (2008). Short duration of initial intravenous treatment in 70 pediatric patients with osteoarticular infections. *Rev. Chil. De Infectologia*, 25(1), 30–36.
- Prior, R. L. (2015). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): new horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J. of Func. Foods*, 18, 797–810.
- Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., & Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. F. Chemistry*, 51, 3273–3279.
- Ragaei, S., Abdel-Aal, M. E.-S., & Noaman, M. (2006). Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *F. Chemistry*, 98, 32–38.
- Rebellato, A. P., Pacheco, B. C., Prado, J. P. & Pallone, J. A. L. (2015). Iron in fortified biscuits: a simple method for its quantification, bioaccessibility study and physicochemical quality. *Food Res. Internat.*, 77, 385–391.
- Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Valli, E., Bendini, A., Toschi, T. G., & Simal-Gandara, J. (2016). Characterization of virgin olive oils produced with autochthonous Galician varieties. *F. Chemistry*, 212, 162–171.
- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., & Valdivia-López, M. A. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *F. Chemistry*, 107, 656–663.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Fr. Rad. Biol. & Medicine*, 20(7), 933–956.
- Rios, H. C. S., Pereira, I. R. O., & Abreu, E. S. (2013). Avaliação da oxidação de óleos, gorduras e azeites comestíveis em processo de fritura. *Revista Ciência & Saúde*, 6(2), 118–126.
- Rocha, J., Eduardo-Figueira, M., Barateiro, A., Fernandes, A., Brites, D., Bronze, M. R., Duarte, C. M. M., Serra, A. T., Pinto, R., Freitas, M., Fernandes, E., Silva-Lima, B., Mota-Filipe, H., & Sepodes, B. (2015). Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and an extract of *Rosmarinus officinalis* in rat models of local and systemic inflammation. *Bas. & Clin. Pharm. & Toxicology*, 116, 398–413.
- Rodriguez, D. B., Raymundo, L. C., Lee, T.-C., Simpson, K. L., & Chichester, C. O. (1976). Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. *An. of Botany, Rome.*, 40, 615–624.
- Ruan, M., Li, Y., Li, X., Luo, J., & Kong, L. (2012). Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Chinese medicinal preparation Guan-Xin-Ning injection by HPLC–DAD–ESI–MSⁿ. *J of Pharm. and Biom. Analysis*, 59, 184–189.
- Rubió, L., Motilva, M.-J., Macià, A., Ramo, T., & Romero, M.-P. (2012). Development of a phenol-enriched olive oil with both its own phenolic compounds and complementary phenols from thyme. *J. Agric. Food Chemistry*, 60, 3105–3112.
- Rupollo, G., Gutkoski, L. C., Martins, I. R., & Elias, M. C. (2006). Efeito da umidade e do período de armazenamento hermético na contaminação natural por fungos e a produção de micotoxinas em grãos de aveia. *Ciênc. Agrotec.*, 30(1), 118–125.

- Sánchez-Rabaneda, F., Jáuregui, O., Casals, I., Andrés-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., & Lamuela-Raventós, R. M. (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *J. Mass Spectrometry*, 38, 35–42.
- Sandoval-Oliveros, M. R., & Paredes-López, O. (2013). Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *J. Agric. Food Chemistry*, 61, 193–201.
- Sargi, S. C., Silva, B. C., Santos, H. M. C., Montanher, P. F., Boeing, J. S., Santos Jr., O. O., Souza, N. E., & Visentainer, J. V. (2013). Antioxidant capacity and chemical composition in seeds rich in omega-3: chia, flax, and perilla. *Food Sci. and Technology*, 33(3), 541–548.
- Segura-Campos, M. R., Salazar-Vega, M. I., Chel-Guerrero, L. A., & Betancur-Ancona, D. A. (2013). Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. *Food Sci. and Technology*, 50(2), 723–731.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *J. of Fun. Foods*, 18, 757–781.
- Shim, Y. Y., Gui, B., Wang, Y., & Reaney, M. J. T. (2015). Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil processing and selected products. *Tr. in F. Science & Technology*, 43, 162–177.
- Silva, B. P., Anunciação, P. C., Matyelka, J. C. S., Lucia, C. M. D., Martino, H. S. D., & Pinheiro-Sant’Ana, H. M. (2017). Chemical composition of Brazilian chia seeds grown in different places. *F. Chemistry*, 221, 1709–1716.
- Silva, L., Pinto, J., Carrola, J., & Paiva-Martins, F. (2010). Oxidative stability of olive oil after food processing and comparison with other vegetable oils. *F. Chemistry*, 121, 1177–1187.
- Sinnhuber, R. O., & Yu, T. C. (1958). 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. II. The quantitative determination of malonaldehyde. *F. Technology*, 12, 9–12.
- Soeiro, B. T., Boen, T. R., Pereira-Filho, E. R. & Lima-Pallone, J. A. (2010). Investigação da qualidade de farinhas enriquecidas utilizando Análise por Componentes Principais (PCA). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 30 (3), 618–624.
- Souza, N. E. & J. V. Visentainer (2012). *Colesterol da mesa ao corpo*. Maringá: Eduem 2 ed., 27–28.
- Spínola, V., Pinto, J., & Castilho, P. C. (2015). Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD–ESI-MSⁿ and screening for their antioxidant activity. *F. Chemistry*, 173, 14–30.
- Swain, T., & Hillis, W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. — The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. of the Sci. of F. and Agriculture*, 10(1), 63–68.
- Tang, Y., Wang, M., Le, X., Meng, J., Huang, L., Yu, P., Chen, J., & Wu, P. (2011). Antioxidant and cardioprotective effects of danshensu (3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxy-propanoic acid from *Salvia miltiorrhiza*) on isoproterenol-induced myocardial hypertrophy in rats. *Phytomedicine*, 18, 1024–1030.
- Tasioula-Margari, M., & Tsabolatidou, E. (2015). Extraction, separation, and identification of phenolic compounds in virgin olive oil by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Antioxidants*, 4, 548–562.
- Trivellini, A., Lucchesini, M., Maggini, R., Mosadegh, H., Villamarin, T. S. S., Vernieri, P., Mensuali-Sodia, A., & Pardossi, A. (2016). *Lamiaceae* phenols as

- multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of “positive-stress”. *Ind. Cr. and Products*, 83, 241–254.
- Tsimidou, M. Z., Nenadis, N., & Mastralexi, A. (2014). Addressing analytical requirements to support health claims on "olive oil polyphenols" (EC Regulation 432/2012). *J. of Agr. and Food Chemistry*, 62, 2459–2461.
- Tuberoso, C. I. G., Kowalczyk, A., Sarritzu, E., & Cabra, P. (2007). Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *F. Chemistry*, 103, 1494–1501.
- Wang, T., He, F., & Chen, G. (2014). Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: a concise review. *J. of Fun. Foods*, 7, 101–111.
- Weickert, M. O., & Pfeiffer, F. H. A. (2008). Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. *Journal of Nutrition*, 138(3), 439–442.
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2009). Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, 182, 49–84.
- Yang, S.-Y., Hong, C.-O., Lee, G. P., Kim, C.-T., & Lee, K.-W. (2013). The hepatoprotection of caffeic acid and rosmarinic acid, major compounds of *Perilla frutescens*, against t-BHP-induced oxidative liver damage. *F. and Chem. Toxicology*, 55, 92–99.
- Zeng, G., Xiao, H., Liu, J., & Liang, X. (2006). Identification of phenolic constituents in *Radix Salvia miltiorrhizae* by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, 20, 499–506.
- Zhang, Y., Smuts, J. P., Dodbiba, E., Rangarajan, R., Lang, J. C., & Armstrong, D. W. (2012). Degradation study of carnosic acid, carnosol, rosmarinic acid, and rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) assessed using HPLC. *J. Agric. F. Chemistry*, 60, 9305–9314.
- Zhang, Y., Yan, Y.-P., Wu, Y.-C., Hua, W.-P., Chen, C., Ge, Q., & Wang, Z.-Z. (2014). Pathway engineering for phenolic acid accumulations in *Salvia miltiorrhiza* by combinational genetic manipulation. *Metab. Engineering*, 21, 71–80.
- Zhao, G.-R., Zhang, H.-M., Ye, T.-X., Xiang, Z.-J., Yuan, Y.-J., Guo, Z.-X., & Zhao, L.-B. (2008). Characterization of the radical scavenging and antioxidant activities of danshensu and salvianolic acid B. *F. and Chem. Toxicology*, 46, 73–81.
- Zhu, Z., Zhang, H., Zhao, L., Dong, X., Li, X., Chai, Y., & Zhang, G. (2007). Rapid separation and identification of phenolic and diterpenoid constituents from *Radix Salvia miltiorrhizae* by high-performance liquid chromatography diode-array detection, electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry and electrospray ionization quadrupole ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, 21, 1855–1865.

CAPÍTULO III

EFEITOS DO CONSUMO DA SEMENTE, FARINHA FIBROSA E ÓLEO DE CHIA (*Salvia hispanica* L.) NOS NÍVEIS DE LIPÍDEOS HEPÁTICOS E COLESTEROL SÉRICO EM CAMUNDONGOS SAUDÁVEIS

CAPÍTULO III

EFEITOS DO CONSUMO DA SEMENTE, FARINHA FIBROSA E ÓLEO DE CHIA (*Salvia hispanica* L.) NOS NÍVEIS DE LIPÍDEOS HEPÁTICOS E COLESTEROL SÉRICO EM CAMUNDONGOS SAUDÁVEIS

Sheila Cristina de Oliveira Alves¹, Daniel Barrera Arellano³, Renato Grimaldi³, Marcella Stahl³, Mário Roberto Maróstica Júnior⁴, Cinthia Baú Betim Cazarin⁴, Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz⁵, Thais Petrochelli Banzato⁵, Karin Maia Monteiro⁵, Sirlene Valerio Tinti⁵, João Ernesto de Carvalho⁵, Débora Barbosa Vendramini-Costa², Marcelo Alexandre Prado¹

¹*Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brasil.*

²*Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-970, Campinas, SP, Brasil.*

³*Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brasil.*

⁴*Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brasil.*

⁵*Divisão de Farmacologia e Toxicologia, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP), 13081-970, Campinas, SP, Brasil.*

* Autor para correspondência: sheilacris@yahoo.com.br

Fone: (19) 3521-0081

Colaborador: mpradofea@gmail.com

Manuscrito será submetido para o periódico Journal of Functional Food.

RESUMO

A semente de chia é uma importante fonte lipídica, proteica, de fibras e de compostos fenólicos, e o seu óleo possui elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados, especificamente o ácido α -linolênico, e baixo teor de ácidos graxos saturados. O objetivo desse estudo foi comparar os efeitos da ingestão de dieta contendo semente, farinha fibrosa ou óleo de chia quanto aos níveis séricos de colesterol total e frações, assim como determinar o perfil e os teores dos ácidos graxos no tecido hepático dos camundongos Balb/C saudáveis. Vinte camundongos Balb/C machos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n=5): o grupo controle consumiu a dieta AIN-93M, e os demais grupos consumiram suas respectivas dietas AIN-93M modificadas, com adição de 20 % de semente de chia, 20 % de farinha fibrosa de chia ou 7 % de óleo de chia, no período de 35 dias. Os camundongos que consumiram dieta com 7 % de óleo e 20 % de semente de chia apresentaram redução significativa nos níveis séricos de colesterol total, 19,76 % e 12,88 %, respectivamente em comparação com o grupo controle. Não houve diferença estatística nos níveis séricos de triglicérides e LDL-colesterol nos grupos que consumiram dieta com semente, farinha e óleo em relação ao grupo controle. A ingestão de dieta com 7 % de óleo de chia reduziu significativamente o teor de lipídeos totais hepático, 32,28 %, em comparação com a dieta controle. Não houve redução significativa nos teores de lipídeos totais hepático para os grupos que consumiram 20 % de semente e 20 % de farinha de chia. A composição dos ácidos graxos no tecido hepático dos animais apresentou aumento significativo no teor de ácido α -linolênico e uma menor razão de ácidos graxos ($\omega 6/\omega 3$)-PUFA para o grupos que consumiram dieta com semente e óleo de chia. Em resumo, as dietas com 7 % de óleo de chia e 20 % de semente de chia diminuíram os níveis séricos de colesterol total e aumentaram o perfil dos ácidos graxos ω mega-3 no tecido hepático dos camundongos. A semente e óleo de chia apresentaram efeito hipocolesterolêmico nos camundongos Balb/C saudáveis. Desta forma, pode-se concluir que a semente e óleo de chia são uma importante fonte de ácidos graxos ω mega-3 e uma alternativa de consumo para contribuir na redução dos níveis séricos de colesterol total.

Palavras-Chave: *Salvia hispanica* L.; ácidos graxos; colesterol, triglicérides.

ABSTRACT

Chia seed is an important source of lipid, protein, fiber and phenolic compounds, and its oil has high levels of polyunsaturated fatty acids, specifically α -linolenic acid, and low levels of saturated fatty acids. The objective of this study was to compare the effects of dietary intake with chia seed, fiber flour or oil on the serum levels of total cholesterol and fractions, as well as on the fatty acid profile and content in hepatic tissue of healthy Balb/C mice. Twenty male Balb/C mice were randomly distributed into four groups ($n = 5$): the control group consumed the AIN-93M diet, and other groups consumed the experimental AIN-93 diets modified with 20 % chia seed, 20 % chia fiber flour or 7 % chia oil during 35 days. Groups 7 % oil and 20 % seed showed a significant reduction in serum total cholesterol levels, 19.76 % and 12.88 %, respectively compared to the control group. There was no statistical difference in the serum triglycerides and LDL-cholesterol levels in the groups that consumed of the seed, flour and oil diet in relation to the control group. Dietary intake with 7% chia oil significantly reduced hepatic total lipid content (32.28 %) compared to the control diet. There was no significant reduction in hepatic total lipid contents for the groups that consumed 20 % of seed and 20 % of flour. The composition of the fatty acids in the hepatic tissue of the animals presented a significant increase of the α -linolenic acid content and a lower fatty acid ratio ($\omega 6/\omega 3$)-PUFA for the groups that consumed diets with chia seed and oil. In summary, diets containing 7 % chia oil and 20 % chia seed decreased serum levels of total cholesterol and increased the omega-3 fatty acids profile in the hepatic tissues of the mice. The chia seed and oil had a hypocholesterolemic effect in healthy Balb/C mice. Thus, this study conclude that chia seed and oil are an important source of omega-3 fatty acids and an alternative of intake to contribute in the reduction of the serum levels of total cholesterol.

Keywords: *Salvia hispanica* L.; fatty acids, cholesterol, triglycerides.

1. INTRODUÇÃO

A dieta alimentar desempenha um papel importante na manutenção da saúde humana e na progressão dos estados patológicos, uma vez que dietas alimentares com alto teor de ácidos graxos saturados, açúcares simples e com altas proporções de ácidos graxos (ω -6/ ω -3)-PUFA estão associadas com níveis elevados de triglicérides sérico e baixo níveis séricos de HDL(*High Density Lipoprotein*)-colesterol, aumentando o risco de desenvolvimento da obesidade e do diabetes (Renaud *et al.*, 2014).

O consumo da semente de chia tem aumentando devido aos benefícios nutricionais, que tem sido reconhecida, principalmente por ser uma importante fonte lipídica (0,30g/g), proteica (0,25g/g), de fibras alimentares (0,37g/g), de minerais e compostos fenólicos (Marineli *et al.*, 2014; Oliveira-Alves, 2017). Além disso, o óleo de chia contém elevado teor de ácido graxo α -linolênico (~60%), de acordo com Boidora *et al.* (2017).

Estudos *in vivo* demonstraram que a ingestão diária de sementes e óleo de chia diminuem os níveis séricos de triglicérides e aumentam os níveis de HDL-colesterol (Ayerza & Coates, 2005), reduz o risco de doenças cardiovasculares (Ayerza & Coates, 2007), apresenta efeito hepatoprotetor (Poudyal *et al.*, 2012), controla o diabetes (Ho *et al.*, 2013) e reduz a obesidade (Marineli *et al.*, 2015).

O ácido α -linolênico (18:3- ω 3) é um ácido graxo poli-insaturado ômega-3 (ω 3-PUFA), que após ser ingerido é convertido enzimaticamente em ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA). O EPA e DHA são importantes reguladores da saúde cardiovascular (O'Connell *et al.*, 2017). Takashima *et al.* (2016) relataram que o EPA e DHA inibem a progressão e desestabilização das placas ateroscleróticas através das propriedades anti-inflamatórias.

Estudos têm reportado que o consumo de fibras alimentares e ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) são capazes de diminuir as concentrações de colesterol plasmático e prevenir distúrbios metabólicos, os quais podem levar à perda das funções endoteliais e a aterosclerose (Hara *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 2016). Os SCFA também são produzidos no intestino grosso a partir da fermentação das fibras alimentares e desempenham funções reguladoras no metabolismo celular dos ácidos graxos, glicose e do colesterol, em vários tecidos periféricos, tanto diretamente como a nível gênico (Richards *et al.*, 2016; Sivaprakasam *et al.*, 2016).

O objetivo desse estudo foi comparar os efeitos da ingestão diária da semente, farinha fibrosa e óleo de chia nos níveis séricos de colesterol total e frações, assim como

determinar o perfil e teores dos ácidos graxos em tecido hepático de camundongos Balb/C machos saudáveis.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados na caracterização das dietas foram o ácido clorídrico e metanol adquiridos da Chemco (Campinas, SP, Brasil); ácido sulfúrico concentrado e hidróxido de sódio da Dinâmica (Diadema, SP, Brasil); ácido bórico, carbonato de sódio, clorofórmio, acetona, éter de petróleo da Synth ((Diadema, SP, Brasil)); sulfato de potássio anidro, sulfato de cobre II, sulfato de sódio anidro da Êxodo Científica (Hortolândia, SP, Brasil). Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), AAPH (2,2'-azobis(2-metil-propianamida)dicloridrato), TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina) e ácido gálico foram obtidos da Sigma-Aldrich (Sigma Co., St. Louis, MO. USA). O reagente Folin-Ciocalteu's foi obtido da Dinâmica (Diadema, Brasil). O Sal de fluoresceína sódica foi proveniente da Vetec Química (São Paulo, Brasil). Hexano grau HPLC (Macron, EUA) e ésteres metílicos do C₄ ao C₂₄ (FAME Mix, Supelco, EUA).

2.2 Equipamentos

Balança analítica (Shimadzu, Modelo AY220, Barueri, Brasil), balança semi-analítica (Bel, São Paulo, Brasil), glicosímetro (Accu-Chek, da Roche Diagnostics, EUA), analisador hematológico (PocH-100 iv Diff, Curitiba, Brasil), microcentrífuga (Eppendorf North America, modelo 5415C, Westbury, USA) e analisador bioquímico (Roche, Modelo Reflotron plus, EUA) foram utilizados durante o ensaio *in vivo* e na realização das análises. Os experimentos *in vivo* e as análises hematológicas e bioquímicas foram realizados na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP). As análises das dietas e dos tecidos foram realizadas no Departamento de Ciências de Alimentos (FEA/UNICAMP).

2.3 Animais

Os experimentos foram realizados em camundongos Balb/C e Swiss machos saudáveis obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica-UNICAMP (CEMIB) com 4 semanas de idade. Os camundongos Balb/C (20-30 g) e Swiss (20-35

g) foram mantidos no biotério da Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/UNICAMP, em salas com temperatura controlada de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 50 a 60 % $\pm$ 5 %, e em ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso livre à água e dieta. Os cuidados dos animais bem como os protocolos de pesquisa estão de acordo com os princípios e diretrizes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo comitê de ética em pesquisa animal do Instituto de Biologia – UNICAMP (n°. 3192-1 e 3194-1), conforme apresentados nos **Anexos 1 e 2**.

2.4 Elaboração das dietas

As dietas foram elaboradas de acordo com *American Institute of Nutrition* (Reeves *et al.*, 1993). Os ingredientes foram adquiridos da Rhoester Indústria e Comércio Ltda. (Araçoiaba da Serra, Brasil) para elaboração das dietas. A dieta AIN-93M foi modificada para os teores de proteínas de 18 % e lipídeos de 7 %. Após a preparação, as dietas foram embaladas em sacos escuros de polietileno e armazenada a -20 °C para minimizar a oxidação dos ácidos graxos. Os animais foram divididos em grupos: dieta AIN-93M como dieta controle (DC), dieta AIN-93M com 20 % de semente de chia triturada (DS20), dieta AIN-93M com 20% com farinha fibrosa (DF20) e dieta AIN-93M com 7 % de óleo de chia (DO7), conforme **Tabela 1**(tópico 3.1).

2.5 Análises das dietas

2.5.1 Composição centesimal

A composição centesimal das dietas foi determinada quanto ao teor de umidade, cinzas, proteínas (AOAC, 2006) e lipídeos (Bligh & Dyer, 1959). O teor de carboidratos foi determinado por diferença de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 360 (BRASIL, 2003). O valor de energia foi determinado utilizando-se o fator de Atwater (Atwater & Bryant, 1900). As análises foram realizadas em triplicata.

2.5.2 Perfil dos ácidos graxos

A extração dos lipídeos das dietas foi realizada segundo o método de Bligh & Dyer (1959), utilizando agitador de tubos (Labnet, modelo S0200, EUA). A composição dos ácidos graxos presentes na fração lipídica das dietas foi determinado

por cromatografia gasosa, após esterificação, utilizando a metodologia descrita por Hartmann & Lago (1973). Os ésteres metílicos foram separados segundo o método AOCS Ce 2-66 (2009), analisados em cromatógrafo gasoso capilar (marca CGC Agilent 6850 Series GC System) com detector de ionização de chama.

Os componentes foram separados em coluna capilar de sílica fundida DB-23 Agilent (50 % cianopropil metil polisiloxano modificado), com dimensões de 60 m, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 0,25 μm . As condições de operação foram fluxo de 1,00 mL/min, temperatura programada do detector de 280 °C, temperatura do injetor a 250 °C, temperatura do forno: 110 °C – 5 min.; 110 – 215 °C – 5 min, 215 °C – 24 min., gás de arraste: hélio; velocidade linear do gás de arraste de 24 cm/s, volume injetado de 1,0 μL . A identificação dos ácidos graxos foi realizada através da comparação do tempo de retenção dos ácidos graxos das amostras com os padrões. As análises cromatográficas foram realizadas em duplicata.

2.6 Compostos fenólicos totais na semente, farinha e óleo de chia

2.6.1 Extração dos compostos fenólicos da semente e farinha de chia

As sementes de chia foram trituradas em moinho (A11 basic BS32 IKA Mill, São Paulo, Brasil) para obtenção da semente de chia triturada. Utilizou-se o método de extração por ultrassom (USE) para extração dos compostos fenólicos (Pizarro *et al.*, 2013). Pesou-se aproximadamente 2 g de amostra (semente de chia triturada ou farinha fibrosa) e em seguida foi adicionado 6 mL de solução metanol:água (80:20, v/v). Após a agitação em vórtex durante 10 s, a amostra foi colocada imediatamente no banho de ultrassom (Tecnal, Piracicaba, Brasil). A extração foi realizada a 25 kHz de frequência e 160W de potência, durante 60 min a 25 ± 3 °C. Depois, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm durante 30 min e o sobrenadante removido do resíduo. A amostra foi extraída novamente por 60 min e os sobrenadantes foram combinados e evaporados até a secura na temperatura de 40 ± 1 °C sob pressão reduzida (Evaporador rotativo Fisatom 801). O resíduo seco foi dissolvido em 2 mL de metanol:água (80:20, v/v), filtrado através de uma membrana de PVDF de 0,22 μm (Millipore, EUA), obtendo assim os extratos da semente e farinha fibrosa, os quais foram armazenados a -18 °C até a análise. Todas as amostras foram extraídas em triplicata.

2.6.2 Extração dos compostos fenólicos do óleo de chia

Utilizou-se o método de extração por ultrassom (USE) para extração dos compostos fenólicos do óleo (Pizarro *et al.*, 2013). Pesou-se aproximadamente 2 g de óleo de chia e em seguida foram adicionados 5 mL de hexano e 5 mL de solução de metanol/água (80:20 v/v). Após agitação em vórtex durante 10 s, colocou-se o tubo imediatamente no banho de ultrassom (Tecnal, Piracicaba, Brasil). As extrações foram realizadas a 25 kHz de frequência e 160 W de potência, durante 60 min a $25 \pm 3^\circ\text{C}$. A amostra foi centrifugada a 4000 rpm durante 10 min e o extrato polar (fase inferior) foi removido. O extrato polar foi evaporado até a secura na temperatura de $40 \pm 1^\circ\text{C}$ sob pressão reduzida. Após evaporação do solvente, o resíduo seco foi dissolvido em 2 mL de metanol:água (80:20, v/v) e filtrado através de uma membrana de PVDF de 0,22 μm (Millipore, EUA), obtendo assim os extratos do óleo de chia, os quais foram armazenados a -18°C até a análise. Todas as amostras foram extraídas em triplicata.

2.6.3 Determinação do conteúdo fenólico total

O conteúdo fenólico total da semente, farinha fibrosa e óleo (extratos metanólicos) foi determinado de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (Swain & Hillis, 1959). Resumidamente, foram misturados 50 μL de extrato, 800 μL de água destilada e 25 μL (0,25 N) de reagente de Folin-Ciocalteu e incubados à temperatura ambiente durante 3 min. Em seguida, adicionou-se 100 μL de solução de carbonato de sódio (1 N) e incubou-se ainda durante 2 horas à temperatura ambiente e no escuro. A absorvância foi lida a 725 nm no leitor de microplacas (SynergyHT, Biotek, Winooski, EUA). O ácido gálico foi utilizado para quantificação e os resultados foram expressos em termos de equivalente de ácido gálico (mg GAE/g chia). Todas as medidas foram realizadas em triplicata para cada amostra analisada.

2.7 Determinação de fibra solúvel e insolúvel na semente e farinha de chia

O conteúdo de fibra alimentar solúvel e insolúvel foi determinado de acordo com o método enzimático-gravimétrico (AOAC, 2006) e o conteúdo de fibra alimentar total foi calculado a partir da soma dos valores de fibra alimentar solúvel e insolúvel.

2.8 Avaliação da toxicidade aguda

2.8.1 Avaliação da toxicidade aguda do óleo de chia

A avaliação da toxicidade aguda foi realizada com o objetivo de verificar o efeito da administração da dose única de óleo de chia por via oral (gavagem). Testes que avaliam a toxicidade sistêmica de dose única são utilizados para classificar e apropriadamente rotular as substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade como estabelecido pela legislação (VALADARES, 2006).

Os animais sadios (camundongos Swiss machos) foram divididos aleatoriamente em três grupos ($n = 3/\text{grupo}$), os quais foram tratados por via oral (v.o.) com diferentes doses de óleo de chia (250 mg/kg, 300 mg/kg e 350 mg/kg) e um grupo controle tratado com dose controle (350 mg/kg de óleo de soja). Os grupos foram observados continuamente por um período de 4 horas e então diariamente, por 15 dias, para avaliação dos sinais gerais de toxicidade, tais como efeitos na locomoção, comportamento (agitação, atividade reduzida, sonolência), respiração, salivação, lacrimejamento, cianose de extremidades e mortalidade, além da massa corporal (OECD, 2002). No período de 15 dias os animais foram alimentados com a dieta padrão da Marca BioBase, e no final desse período, os animais foram eutanasiados. A caracterização centesimal da dieta da BioBase é apresentada no **Anexo 3**.

2.8.2 Avaliação da toxicidade aguda da semente e farinha fibrosa de chia

A avaliação da toxicidade aguda foi realizada com o objetivo de verificar o efeito da administração das dietas AIN-93M (DC), dieta AIN-93M contendo 20 % de semente triturada (DS20) e dieta AIN-93M contendo 20 % de farinha fibrosa de chia (DF20). Os animais sadios (camundongos Swiss machos) foram divididos aleatoriamente em três grupos ($n = 3/\text{grupo}$), os quais foram tratados com as dietas experimentais (DC, DS20, DF20). Os grupos foram observados diariamente, por 25 dias, para avaliação de sinais gerais de toxicidade, tais como efeitos na locomoção, comportamento (agitação, atividade reduzida, sonolência), respiração, salivação, lacrimejamento, cianose de extremidades e mortalidade, além da massa corporal e consumo diário da dieta (OECD, 2002). Após os 25 dias, os animais foram eutanasiados.

2.9 Efeitos das dietas contendo óleo, semente e farinha de chia em animais sadios.

Foram utilizados diferentes grupos experimentais para estudar o efeito hipocolesterolêmico da semente, farinha fibrosa e óleo de chia. Foram avaliados colesterol, glicemia, parâmetros bioquímicos e hematológicos, além da capacidade antioxidante em amostras de soro de camundongos Balb/C machos. Vinte camundongos saudáveis foram aleatoriamente divididos em quatro grupos (n=5/grupo), os quais receberam as seguintes dietas no período de 35 dias:

- Grupo I: Dieta controle (DC) - dieta AIN-93M;
- Grupo II: Dieta com semente de chia (DS20) – dieta AIN-93M com adição de 20 % (m/m) de semente de chia triturada;
- Grupo III: Dieta com farinha fibrosa de chia (DF20) – dieta AIN-93M com adição de 20 % (m/m) de farinha fibrosa de chia;
- Grupo IV: Dieta com óleo de chia (DO7) – dieta AIN-93M com adição de 7 % (m/m) de óleo de chia.

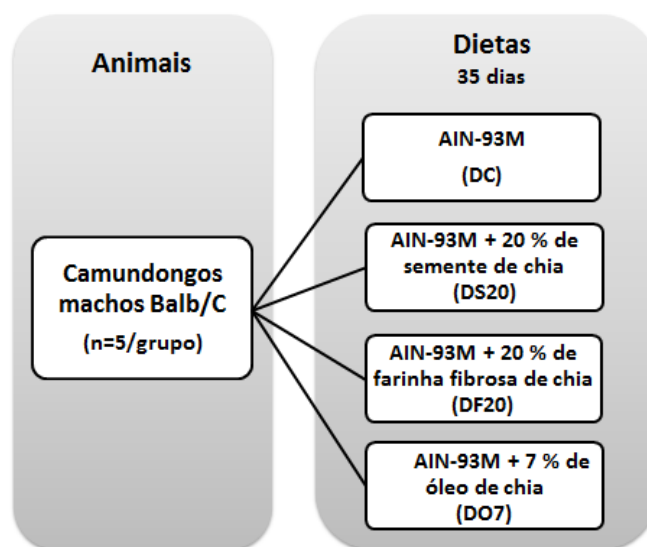


Figura 1. Esquema ilustrativo do ensaio experimental.

O experimento foi realizado no período de 35 dias no biotério da Divisão de Farmacologia e Toxicologia – CPQBA/UNICAMP, em salas com temperatura controlada de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 60 % a 50 % $\pm$ 10 %, e em ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso livre à água e dieta.

2.10 Avaliações dos animais

Os animais foram avaliados diariamente quanto ao consumo de dieta e semanalmente quanto ao ganho de massa corporal. Após os 35 dias (36º dia), os animais foram avaliados quanto a glicemia e em seguida eutanasiados por aprofundamento de anestesia, sendo avaliado o perfil hematológico e as funções hepáticas, por meio de análises bioquímicas dos níveis séricos de gama-glutamil transferase (GGT), LDL (*Low Density Lipoprotein*)-colesterol, HDL (*High Density Lipoprotein*)-colesterol, colesterol total e triglicérides utilizando kits colorimétricos comerciais (Roche, EUA). Os tecidos (fígado, rins, coração, pulmão e baço) foram retirados e pesados. Os tecidos (coração, rins e fígado) foram armazenados em ultrafreezer (Revco, ULT1386-3-D36, Asheville, EUA) para análises posteriores.

2.10.1 Massa corporal

A quantidade de dieta consumida por grupo experimental foi avaliada por meio do registro diário da ingestão alimentar da mesma pelos animais (variação entre a oferta e as sobras da dieta deixadas nas caixas) durante os 35 dias de ensaio, para obtenção da média de ingestão. Durante todo o período experimental, os animais foram submetidos semanalmente à avaliação da massa corpórea, a fim de minimizar a manipulação e estresse dos animais.

2.10.2 Glicemia

A dosagem glicêmica dos grupos foi realizada através de glicosímetro Accu-Chek Performa (Accu-Chek, da Roche Diagnostics, EUA), com a utilização da tira-teste, com amostras de sangue obtidas da veia caudal dos animais, após o jejum de 8 horas, no 36º dia do ensaio experimental.

2.11 Eutanásia dos animais

No final do período experimental, após jejum de 8 horas, todos os animais foram pesados e anestesiados (100 mg/kg ketamina + 5 mg/kg xilazina). Em seguida o sangue foi coletado por punção cardíaca e os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento de anestesia. O sangue de cada animal foi distribuído em microtubos de 0,5 mL contendo 10 µL de anticoagulante EDTA sódico a 10 % para realização dos parâmetros hematológicos, e em um microtubo de 1,0 mL sem EDTA para centrifugação do soro e posterior realização das análises bioquímicas.

2.11.1 Avaliação dos parâmetros sanguíneos

O sangue coletado em microtubos com EDTA (0,5 mL de sangue para 10 µL de EDTA) foi analisado em aparelho veterinário para análise de hemograma (Sysmex®, modelo pocH-100iV, Curitiba, Brasil), avaliando-se: leucócitos totais (WBC), eritrócitos (RBC), hematócritos (HCT), hemoglobina (Hbg) e plaquetas (PLT).

2.11.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

A determinação dos parâmetros bioquímicos foi realizada no soro sanguíneo, portanto os microtubos de 1,0 mL foram centrifugados durante 15 min a 3500 rpm (rotações por minuto), o sobrenadante (soro) foi coletado em microtubo e armazenado a 10 °C para posterior análise. Os parâmetros bioquímicos foram dosados através do analisador automatizado Reflotron plus (Roche, EUA), empregando o método cinético UV, utilizando-se *kits* comerciais de reagentes padrão Reflotron Roche.

Todas as medidas de atividade enzimática foram realizadas na temperatura de 37 °C (selecionada no aparelho). Uma alíquota de 30 µL de soro de cada animal foi inserida no centro da zona vermelha reativa da tira, removendo anteriormente a banda protetora. Após 15 s, a tira foi introduzida horizontalmente no aparelho e o aparecimento no visor confirma que a leitura do código magnético específico do teste foi corretamente lida pelo mesmo. Os parâmetros analisados foram gama-glutamil transferase (GGT), LDL-colesterol, HDL-colesterol, colesterol total e triglicérides.

2.11.3 Peso relativo dos tecidos

Após eutanásia, foram excisados os tecidos (coração, fígado, rins, baço e pulmão) de cada animal, os quais foram pesados em balança analítica (Bel, São Paulo, Brasil). O fígado, rins e coração foram separados em frascos, identificados e armazenados em ultrafreezer (Revco, ULT1386-3-D36, Asheville, EUA) para análises posteriores.

2.11.4 Atividade antioxidante nos rins e coração

2.11.4.1 Preparo do homogenato

A concentração de proteína nos homogenatos dos rins e do coração foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Os homogenatos foram tratados com etanol: água ultrapura (2:1) e ácido metafosfórico 0,75 mol/L (Batista *et al.*, 2014). As amostras foram centrifugadas a 14000 g durante 5 min a 4 °C e o

sobrenadante removido. A capacidade antioxidante dos extratos dos homogenatos do rins e coração foi estimada pelo ensaio de FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro) conforme método descrito por Benzie & Strain (1996) e ORAC (Capacidade de Redução do Radical Oxigênio) de acordo com o método descrito por Ou *et al.* (2013).

2.11.4.2 Ensaio FRAP

O reagente FRAP foi preparado sob proteção da luz com tampão acetato 300 mmol/L (pH 3,6), 10 mmol 2,4,6-tris (2-piridil)-s-triazina (TPTZ) em solução de 40 mmol de HCl e 20 mmol FeCl₃ (Benzie & Strain, 1996). Em eppendorf foram adicionados 20 µL da amostra, 600 µL de reagente FRAP e 60 µL de água ultrapura e em seguida foram misturados e mantidos em banho-maria durante 30 min a 37 °C. Após resfriamento até a temperatura ambiente, todas as amostras foram lidas a 595 nm no leitor de microplacas (SynergyHT, Biotek, Winooski, EUA). Preparou-se também uma curva padrão Trolox (10-800 µmol TE). Os resultados foram expressos em µmol Trolox equivalente (TE)/mg proteína. Todas as medidas foram realizadas em triplicata para cada homogenato dos tecidos.

2.11.4.3 Ensaio ORAC

Os ensaios ORAC (Capacidade de Redução do Radical Oxigênio) baseia-se na capacidade fluorescente da fluoresceína sódica na presença de radicais de oxigênio, sendo realizado conforme o método descrito por Ou *et al.* (2013). O radical peroxil foi gerado pela solução de AAPH (2,2'-azobis (2-metilpropionamidina) dicloridrato) sendo preparada imediatamente antes da análise e utilizada fluoresceína como substrato. Sob proteção da luz, foram adicionados 20 µL de amostra, 120 µL de fluoresceína em tampão fosfato (pH 7,4) e 60 µL de AAPH em microplacas escuras. O leitor de microplacas (SynergyHT, Biotek, Winooski, USA) foi ajustado (filtros fluorescentes, comprimento de onda de excitação, 485 nm, comprimento de onda de emissão, 520 nm) e Trolox foi utilizado como padrão (5-50 µmol). Os valores de ORAC foram expressos em µmol Trolox equivalente (TE)/mg proteína. Todas as medidas foram realizadas em triplicata para cada extrato analisado.

2.11.5 Análises hepáticas

2.11.5.1 Teor de lipídeos e análise de colesterol total e triglicérides

O teor de lipídeos totais no tecido hepático dos animais foi determinado utilizando a metodologia de extração de lipídeos totais em tecido animal (Folch *et al.*, 1957). Adicionou-se 1,9 mL de clorofórmio: metanol (2:1, v/v) em 0,1 g de fígado fresco, misturou-se e submeteu-se à trituração (Polytron, EUA). Assim, uma alíquota de 0,4 mL de metanol PA foi adicionada e o material foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi recolhido, adicionado 0,8 mL de clorofórmio, 0,64 mL de solução de NaCl a 0,73 % e em seguida foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 min.

O sobrenadante foi descartado e na fase inferior foi realizada a adição de 1 mL de solução de Folch (clorofórmio:metanol:água:NaCl 0,2 % - 3:48:47:2, v/v/v/v), sendo lavada por três vezes. Em seguida foi adicionado 5 mL de solução de clorofórmio:metanol (2:1, v/v), e o conteúdo foi seco em estufa a 37 °C por 8 hs. O teor de lipídeos totais da amostra foi determinado, e o conteúdo seco foi ressuspense em 1 mL de isopropanol para as análises de colesterol total e triglicérides. Os níveis hepáticos de colesterol total e triglicérides foram determinados utilizando kits de ensaio enzimático, de acordo com as instruções do fabricante para os respectivos kits (Colestat enzimático AA e TG color GPO/PAP AA, Wiener laboratories, Rosario, Argentina).

2.11.5.2 Perfil dos ácidos graxos no fígado

A extração lipídica do fígado dos camundongos Balb/C foi realizada segundo método de Folch (1957), com adaptações. A extração seguiu todas as etapas conforme o item 2.11.5.1, porém o conteúdo de lipídeos foi ressuspense em 1 mL de éter de petróleo. A composição dos ácidos graxos presentes na fração lipídica do tecido hepático dos animais foi determinada por cromatografia gasosa, após esterificação, utilizando a metodologia descrita por Hartmann & Lago (1973).

Os ésteres metílicos foram separados segundo o método AOCS Ce 2-66 (2009), analisados em cromatógrafo gasoso capilar (marca CGC Agilent 6850 Series GC System) com detector de ionização de chama. Os componentes foram separados em coluna capilar de sílica fundida DB-23 Agilent (50 % cianopropil metil polisiloxano modificado), com dimensões de 60 m, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 0,25 µm. As condições de operação foram fluxo de 1,00 mL/min, temperatura programada do detector de 280 °C, temperatura do injetor a 250 °C, temperatura do forno: 110 °C – 5 min.; 110 – 215 °C – 5 min, 215 °C – 24 min., gás de arraste: hélio; velocidade linear do gás de arraste de 24 cm/s, volume injetado de 1,0 µL. A quantificação e identificação dos ácidos graxos foi realizada através da comparação do

tempo de retenção dos ácidos graxos das amostras e dos padrões. As análises cromatográficas foram realizadas em duplicata.

2.12 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão, avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação de média, o teste de Tukey. Valores de p menores do que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os cálculos foram realizados utilizando o *Software* estatístico *GraphPad Prism* versão 5.0, (San Diego Califórnia, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises das dietas

A **Tabela 1** apresenta os ingredientes, a composição química e calórica e o perfil dos ácidos graxos das dietas experimentais. Pode-se observar que as dietas são isocalóricas, apresentando em média $4081,32 \pm 10,53$ kcal/kg, com 18 % de proteínas e 7 % de lipídeos totais.

As dietas contendo 20 % de semente de chia (DS20) e 7 % de óleo de chia (DO7) apresentam elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) e baixa razão (ω -6/ ω -3)-PUFA em comparação com a dieta controle (DC), de acordo com o objetivo deste estudo (**Tabela 1**). A vantagem de uma dieta em apresentar baixa razão (ω -6/ ω -3)-PUFA está no fato de que o desenvolvimento de doenças crônicas, tais como doença da artéria coronária, diabetes e câncer tem sido correlacionado com o desequilíbrio da ingestão de ω 6-PUFA e ω 3-PUFA pela população (Khan & He, 2017; Messamore *et al.*, 2017; Timilsena *et al.*, 2017). Assim, uma dieta que apresenta equilíbrio nos níveis de PUFA e (ω -6/ ω -3)-PUFA representa um potencial a ser explorado na prevenção do desenvolvimento de doenças crônicas.

O conteúdo fenólico total (TPC) da semente e farinha de chia foram determinados neste estudo e os seus teores nas dietas são apresentados na **Tabela 1**. A semente e farinha fibrosa de chia não apresentaram diferença significativa no conteúdo de TPC, sendo $1,44 \pm 0,02$ mg GAE/g e $1,49 \pm 0,01$ mg GAE/g, respectivamente. O óleo de chia apresenta baixo teor de TPC, 0,03 mg GAE/g. O perfil dos compostos fenólicos presentes na semente e farinha de chia são similares, sendo que os principais compostos identificados foram o ácido caféico, danshensu, ácido rosmarínico e ácido ferúlico, os quais possuem atividade eletroquímica (Oliveira-Alves *et al.*, 2017).

Tabela 1. Composição das dietas experimentais (g/kg).

	AIN-93M	DS20	DF20	DO7
<i>Ingredientes (g/kg)</i>				
Caseína ¹	200	160	140	200
Maltodextrina	155	155	155	155
Amido de milho	376	276	256	376
Sacarose	100	100	100	100
Óleo de soja	70	10	50	0
Óleo de chia	0	0	0	70
Semente de chia	0	200	0	0
Farinha fibrosa de chia	0	0	200	0
Celulose	50	50	50	50
Mineral mix (AIN-93M-MX)	35	35	35	35
Vitamina mix (AIN-93-VX)	10	10	10	10
L-Cistina	1,8	1,8	1,8	1,8
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>tert</i> -Butil hidroquinona	0,008	0,008	0,008	0,008
<i>Composição (g/kg dieta)</i>				
Proteínas totais (g/kg dieta)	183,70 ± 0,37	185,80 ± 0,18	186,20 ± 0,29	182,50 ± 0,32
Lipídeos totais (g/kg dieta)	71,40 ± 0,07	75,50 ± 0,03	75,51 ± 0,03	72,40 ± 0,03
Carboidratos totais (g/kg dieta)	675,20 ± 0,14	667,40 ± 0,08	661,20 ± 0,10	676,90 ± 0,12
Energia (kcal/kg dieta)	4078,20 ± 0,49	4092,30 ± 0,37	4065,50 ± 0,44	4089,30 ± 0,39
<i>Chia</i>				
Fibra alimentar total (g/kg dieta)*	-	71,0 ± 0,60	81,8 ± 0,90	-
Fibra alimentar insolúvel (g/kg dieta)*	-	63,80 ± 0,49	72,80 ± 0,88	-
Fibra alimentar solúvel (g/kg dieta)*	-	7,20 ± 0,11	9,01 ± 0,01	-
Fenólicos totais (mg GAE/kg dieta)*	-	288,00 ± 0,08	298,00 ± 0,07	0,21 ± 0,05
<i>Ácidos graxos (g/kg dieta)</i>				
Palmitico (C16:0)	12,13 ± 0,09	9,19 ± 0,02	11,26 ± 0,02	8,76 ± 0,03
Esteárico (C18:0)	4,07 ± 0,05	4,18 ± 0,04	4,10 ± 0,08	4,47 ± 0,03
Oléico (C18:1n-9)	25,74 ± 0,06	10,50 ± 0,02	21,03 ± 0,06	7,82 ± 0,23
Linoléico (C18:2n-6)	49,98 ± 0,21	23,89 ± 0,08	41,88 ± 0,18	18,18 ± 0,04
α -Linolênico (C18:3n-3)	5,47 ± 0,05	50,39 ± 0,02	19,51 ± 0,02	58,80 ± 0,14
SFA total	18,31 ± 0,17	14,69 ± 0,03	17,17 ± 0,24	14,87 ± 0,09
MUFA total	26,25 ± 0,23	11,04 ± 0,04	21,45 ± 0,05	8,15 ± 0,07
PUFA total	55,45 ± 0,15	74,28 ± 0,06	61,39 ± 0,18	76,98 ± 0,11
(n-6/n-3)-PUFA razão	9,14 ± 0,01	0,47 ± 0,01	2,15 ± 0,01	0,31 ± 0,01

Grupo DC: AIN-93M dieta padrão controle; Grupo DS20: 20 % (m/m) de semente de chia triturada na dieta;

Grupo DF20: 20 % (m/m) de farinha fibrosa de chia na dieta; DO7: 7 % (m/m) de óleo de chia na dieta.

SFA: ácidos graxos saturados; MUFA: ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: ácidos graxos poli-insaturados.

¹ Cálculo baseado no conteúdo de proteínas igual a 86 % para fornecer 18 g de proteínas/100g de dieta.

* Cálculo baseado nos resultados obtidos a partir das análises da semente, farinha fibrosa e óleo de chia.

As dietas DS20 e DF20 possuem elevado teor de fibra alimentar insolúvel. Os conteúdos de fibras alimentares totais obtidos neste estudo para semente e farinha de chia foram $35,90 \pm 0,80$ g/100g e $40,90 \pm 0,80$ g/100g, respectivamente. As fibras são classificadas como fibras solúveis ou insolúveis. As fibras solúveis são viscosas ou facilmente fermentáveis no cólon, tais como pectina, inulina e gomas, porém as fibras insolúveis, tais como celulose, lignina e algumas hemiceluloses, tem a ação no aumento do volume do bolo fecal, mas com limitada fermentação no cólon (Bernaud & Rodrigues, 2013).

Estudos epidemiológicos relacionam o aumento da incidência de doenças inflamatórias e câncer intestinal nos países desenvolvidos devido ao baixo consumo de fibras alimentares (Sivaprakasam *et al.*, 2016). Sendo assim, a chia representa uma fonte alternativa de fibras alimentares, o que reforça seu consumo como agente preventivo contra doenças do trato gastrointestinal.

3.2 Avaliação da toxicidade aguda

A avaliação da toxicidade aguda do óleo de chia foi realizada de acordo com o protocolo internacional (OECD, 2002). Os animais foram observados continuamente por um período inicial de 4 horas e depois no período de 15 dias. A avaliação da toxicidade aguda do óleo de chia (250 mg/kg a 350 mg/kg) e do óleo de soja foi realizado *in vivo*. As doses utilizadas estão de acordo com as porcentagens de consumo diário de lipídeos sugerido pela Sociedade Americana de Nutrição (Reeves *et al.*, 1993). As doses de óleo de chia não promoveram sinais de toxicidade durante as primeiras 4 horas de observação, assim como durante o período de observação de 15 dias, os animais não apresentaram alterações de comportamento, sinais de toxicidade e/ou perda de massa corporal.

Tabela 2. Ensaio de toxicidade aguda do óleo de chia.

Parâmetros	350mg/kg óleo soja	350mg/kg óleo de chia	300mg/kg óleo de chia	250mg/kg óleo de chia
Massa corporal inicial (g)	$26,87 \pm 1,15^a$	$27,10 \pm 3,24^a$	$25,73 \pm 1,50^a$	$28,67 \pm 1,15^a$
Massa corporal final (g)	$34,06 \pm 2,47^a$	$32,40 \pm 2,81^a$	$31,17 \pm 3,47^a$	$32,57 \pm 2,65^a$

Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Não foi observado diferença significativa entre a massa corporal inicial e final dos camundongos tratados com diferentes doses de óleo de chia e óleo de soja (**Tabela 2**). Após 15 dias, os animais foram submetidos à eutanásia, e seus tecidos (coração, pulmão, fígado, rins e baço) foram analisados macroscopicamente, os quais não exibiram sinais de toxicidade.

Do mesmo modo, a toxicidade aguda das dietas contendo 20 % de semente ou 20 % farinha fibrosa de chia foram avaliadas (**Tabela 3**). Durante o período de observação de 25 dias, os animais não apresentaram alterações de comportamento, sinais de toxicidade e perda de massa corporal. O consumo da dieta (g/dia) e ganho de massa corporal (g/dia) foram semelhantes entre os grupos, não apresentando diferença estatística significativa. Após os 25 dias, os animais foram submetidos à eutanásia, e seus tecidos (coração, pulmão, fígado, rins e baço) foram analisados macroscopicamente, não sendo observado sinais de toxicidade.

Tabela 3. Ensaio de toxicidade aguda das dietas contendo 20% de semente e 20% de farinha de chia.

Parâmetros	DC	DS20	DF20
Massa corporal inicial (g)	36,56 ± 1,27 ^a	36,03 ± 1,87 ^a	34,54 ± 2,07 ^a
Massa corporal final (g)	40,18 ± 1,16 ^a	39,19 ± 1,81 ^a	38,13 ± 1,64 ^a
Ganho massa corporal (g/dia)	0,18 ± 0,10 ^a	0,15 ± 0,15 ^a	0,17 ± 0,18 ^a
Consumo da dieta (g/dia)	3,82 ± 0,45 ^a	3,77 ± 0,38 ^a	3,78 ± 0,31 ^a
Consumo da dieta (Kcal/dia)	15,58 ± 0,32 ^a	15,42 ± 0,27 ^a	15,39 ± 0,22 ^a
Índice de eficiência alimentar*	0,04 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,01 ^a

* Índice de eficiência alimentar = (ganho massa corporal dia/consumo dia).

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão.

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa (p<0,05) pelo teste de Tukey.

3.3 Efeitos das dietas contendo óleo, semente e farinha de chia em animais sadios.

3.3.1 Consumo alimentar e massa corporal

A **Figura 2** apresenta o gráfico de variação da massa corporal dos grupos experimentais ao longo de 35 dias de ensaio. Observa-se que houve ganho crescente de massa corporal em todos os grupos experimentais no período do ensaio. Não houve diferença significativa entre o grupos que consumiram as dietas DC, DO7, DS20 e DF20. A massa corporal inicial e massa corporal final entre os grupos experimentais não apresentaram diferença estatística (**Tabela 4**).

Não houve diferença significativa quanto ao consumo diário e ganho diário de massa corporal entre os grupos experimentais, sendo o consumo médio diário dos grupos de $3,56 \pm 0,09$ g/dia. Os grupos DS20, DF20 e DO7 não apresentaram diferença significativa quanto ao índice de eficiência alimentar.

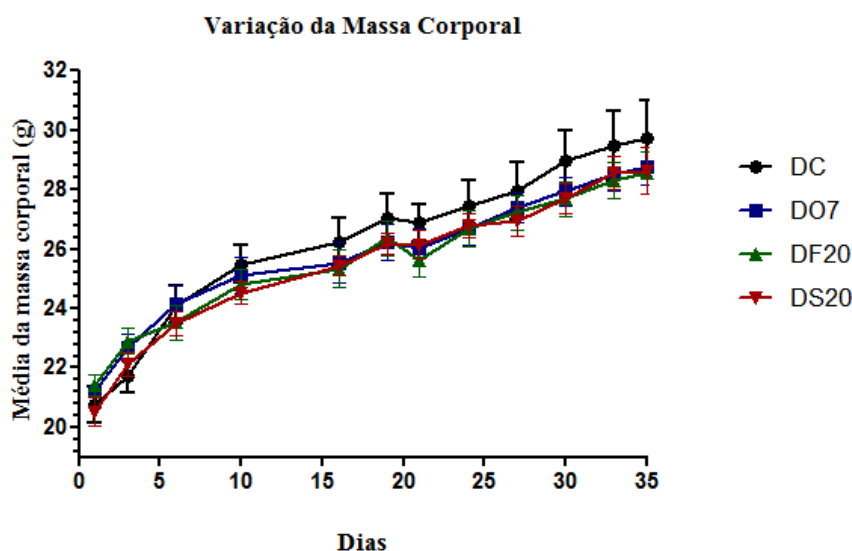


Figura 2. Variação da massa corporal (g) dos grupos experimentais alimentados com dieta controle AIN-93M (DC), dieta AIN-93M contendo 20 % de semente de chia (DS20), contendo 20 % de farinha fibrosa de chia (DF20) ou 7 % de óleo de chia (DO7) ao longo de 35 dias. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão e erro padrão dos grupos. One way ANOVA, seguido de teste de Tukey para comparação dos diferentes grupos ($p < 0,05$).

Tabela 4. Crescimento e parâmetros de consumo alimentar dos animais.

Parâmetros	DC	DS20	DF20	DO7
Massa corporal inicial (g)	$20,76 \pm 1,38^a$	$20,52 \pm 1,05^a$	$21,40 \pm 0,80^a$	$21,23 \pm 1,26^a$
Massa corporal final (g)	$29,71 \pm 1,84^a$	$28,62 \pm 1,36^a$	$28,54 \pm 1,58^a$	$28,78 \pm 1,73^a$
Ganho de massa corporal (g/dia)	$0,25 \pm 0,10^a$	$0,24 \pm 0,12^a$	$0,21 \pm 0,15^a$	$0,22 \pm 0,17^a$
Consumo da dieta (g/dia)	$3,46 \pm 0,76^a$	$3,61 \pm 0,71^a$	$3,54 \pm 0,80^a$	$3,62 \pm 0,77^a$
Consumo da dieta (Kcal/dia)	$14,10 \pm 0,51^a$	$14,75 \pm 0,87^a$	$14,41 \pm 0,94^a$	$14,77 \pm 0,52^a$
Índice de eficiência alimentar*	$0,07 \pm 0,01^a$	$0,06 \pm 0,01^a$	$0,06 \pm 0,01^a$	$0,06 \pm 0,01^a$

* Índice de eficiência alimentar = (ganho massa corporal dia/consumo dia).

Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os níveis de glicemia foram avaliados nos grupos experimentais no 36° dia de ensaio, não havendo diferença significativa entre os grupos (**Figura 3**). Ho *et al.* (2013) demonstraram que o consumo de sementes de chia, inteiras ou trituradas, por 13 pacientes contribuíram na atenuação dos níveis de glicose no sangue.

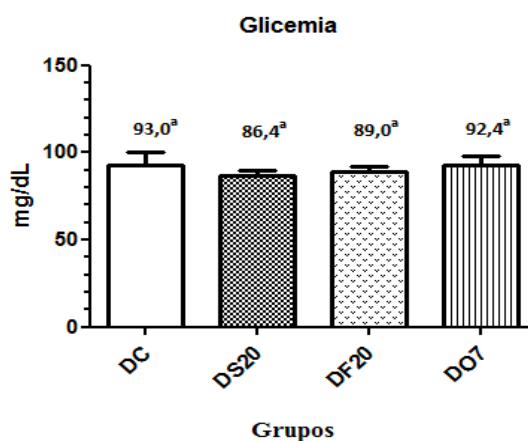


Figura 3. Níveis de glicemia dos grupos experimentais alimentados com dieta controle AIN-93M (DC), dieta AIN-93M contendo 20 % de semente de chia (DS20), 20 % de farinha fibrosa de chia (DF20) ou 7 % de óleo de chia (DO7) ao longo de 35 dias. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão dos grupos. One way ANOVA, seguido de teste de Tukey para comparação dos diferentes grupos ($p < 0,05$).

3.3.2 Avaliação da massa relativa dos tecidos

A **Tabela 5** apresenta a massa relativa dos tecidos dos camundongos. De acordo com os dados de massa corporal, as massas relativas dos tecidos (coração, pulmão, fígado, baço e rins) dos animais dos grupos experimentais mantiveram-se semelhantes, não havendo diferença estatística entre os grupos experimentais.

Tabela 5. Massa relativa dos tecidos (massa do tecido (g)/massa final do animal (g)).

Tecidos	DC	DS20	DF20	DO7
Baço	0,43 $\pm$ 0,06 ^a	0,32 $\pm$ 0,02 ^b	0,35 $\pm$ 0,01 ^b	0,34 $\pm$ 0,01 ^b
Coração	0,48 $\pm$ 0,04 ^a	0,45 $\pm$ 0,02 ^a	0,50 $\pm$ 0,05 ^a	0,48 $\pm$ 0,02 ^a
Fígado	3,62 $\pm$ 0,23 ^a	3,79 $\pm$ 0,21 ^a	3,64 $\pm$ 0,18 ^a	3,52 $\pm$ 0,16 ^a
Pulmão	0,59 $\pm$ 0,03 ^a	0,58 $\pm$ 0,04 ^a	0,56 $\pm$ 0,05 ^a	0,57 $\pm$ 0,05 ^a
Rins	1,43 $\pm$ 0,05 ^a	1,41 $\pm$ 0,06 ^a	1,45 $\pm$ 0,04 ^a	1,46 $\pm$ 0,09 ^a

Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Entretanto, houve diferença significativa entre a massa relativa do baço do grupo DC ($0,43 \pm 0,06$) em comparação com os grupos experimentais que consumiram semente de chia e seus produtos. Os grupos DS20, DF20, DO7 apresentaram significativamente menor massa relativa do baço em comparação ao grupo DC, sugerindo menor atividade hemocaterética do baço destes animais. A função hemocaterética é a atuação do baço na metabolização das células sanguíneas, tendo como principais elementos os eritrócitos e a hemoglobina (Jamra, 1941).

3.3.3 Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Os parâmetros hematológicos fornecem o perfil dos elementos celulares do sangue, demonstrando os valores quantitativos dos leucócitos totais (WBC), eritrócitos (RBC) e plaquetas (PLT), bem como a concentração de hemoglobina (HGB) e a porcentagem de hematócritos (% hemácias no sangue). A **Tabela 6** apresenta os parâmetros hematológicos dos grupos experimentais

Os grupos experimentais DS20, DF20 e DO7 não exibiram diferença significativa para valores de WBC, RBC, HGB e HCT, e esses valores estão de acordo com o intervalo de referência descrito por Araujo *et al.* (2015).

Tabela 6. Parâmetros hematológicos dos grupos experimentais.

Parâmetros hematológicos	Referência*	DC	DS20	DF20	DO7
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	2,00-5,90	$3,44 \pm 1,24^a$	$3,00 \pm 1,52^a$	$2,60 \pm 0,66^a$	$2,32 \pm 1,67^a$
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	7,40-11,10	$10,13 \pm 0,80^a$	$10,44 \pm 0,38^a$	$10,47 \pm 0,16^a$	$10,58 \pm 0,45^a$
HGB (g/dL)	11,50-15,60	$14,08 \pm 1,03^a$	$13,86 \pm 0,50^a$	$14,08 \pm 0,24^a$	$14,52 \pm 0,68^a$
HCT (%)	34,30-51,30	$48,82 \pm 3,56^a$	$49,58 \pm 1,51^a$	$49,74 \pm 0,97^a$	$50,92 \pm 2,26^a$
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	900-1600	$1385,0 \pm 85,68^{ab}$	$1250,0 \pm 67,09^c$	$1442,0 \pm 65,26^a$	$1300,0 \pm 47,19^{bc}$

Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

* Valores de referência para camundongos Balb/C machos (Fonte: Araújo *et al.*, 2015; Thrall, 2007).

Não houve diferença significativa nos valores obtidos de plaquetas nos grupos DF20 e DO7 em comparação com o grupo DC ($1385 \pm 86,68$). Porém, o grupo DS20 ($1250,0 \pm 67,09$) apresentou redução significativa nas quantidades de plaquetas no sangue (9,75 %) em comparação com o grupo DC (**Tabela 6**). Do mesmo modo, não houve diferença significativa no número de plaquetas entre os grupos DS20 e DO7.

Além disso, os valores obtidos de plaquetas nos grupos experimentais estão de acordo com o intervalo de referência descrito por Thrall (2007).

As plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos anucleados dos megacariócitos, com várias organelas citosólicas, com formato discóide quando circulam pelo sangue e formato esférico quando estão desempenhando sua função na hemostasia, fazem parte dos constituintes sanguíneos junto com os leucócitos e eritrócitos, e se localizam na periferia dos vasos sanguíneos (Thrall, 2007; Kajihara *et al.*, 2007).

Além dos parâmetros hematológicos, foram também avaliados os efeitos das dietas nos níveis de enzimas hepáticas. A gama glutamil transferase (GGT) é uma enzima responsável pelo catabolismo extracelular da glutatona, podendo ser produzida por diferentes tecidos, porém a maior parte da GGT presente no soro provém do fígado (Emdin *et al.*, 2005). A alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima biomarcadora de lesões hepáticas, portanto elevados índices dessa enzima indicam danos no fígado (Subramani *et al.*, 2014; Loeb & Quimby, 1999).

A **Tabela 7** demonstra os resultados dos parâmetros bioquímicos e os níveis séricos de triglicérides, colesterol total, HDL-colesterol e LDL-colesterol avaliados nos grupos experimentais. Os valores obtidos de ALT nos grupos experimentais estão de acordo com o intervalo de referência descrito por Loeb & Quimby (1999).

Tabela 7. Parâmetros bioquímicos dos grupos experimentais.

Parâmetros	Referência*	DC	DS20	DF20	DO7
Colesterol total	99,00-148,40	136,60 ± 10,52 ^a	119,00 ± 7,87 ^b	139,00 ± 7,84 ^a	109,60 ± 6,46 ^b
HDL-colesterol	-	74,02 ± 5,55 ^{ab}	67,18 ± 5,70 ^b	78,86 ± 4,29 ^a	57,16 ± 4,10 ^c
LDL-colesterol	-	32,82 ± 16,17 ^a	24,10 ± 7,95 ^a	26,62 ± 7,52 ^a	23,80 ± 2,19 ^a
Triglicérides	146,00-182,00	148,80 ± 22,62 ^a	138,60 ± 15,46 ^a	167,60 ± 28,05 ^a	143,20 ± 20,17 ^a
GGT	-	<5,0 ± 0,0 ^a	<5,0 ± 0,0 ^a	<5,0 ± 0,0 ^a	<5,0 ± 0,0 ^a
ALT	14,00-120,00	54,88 ± 15,45 ^a	83,02 ± 15,51 ^a	54,52 ± 20,06 ^a	68,04 ± 23,78 ^a

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão.

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa (p<0,05) pelo teste de Tukey.

* Valor de referência de camundongos Balb/C machos (Fonte: Loeb & Quimby, 1999).

Os níveis das enzimas ALT e GGT não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais, portando as dietas consumidas não promoveram

alterações hepáticas em relação ao grupo controle (DC). Estudos biológicos *in vivo* têm demonstrado que o consumo de óleo e semente de chia possuem efeito de hepatoprotetor (Poudyal *et al.*, 2012; Rincón-Cervera *et al.*, 2016).

Os níveis de triglicérides séricos obtidos nos grupos experimentais estão de acordo com o intervalo de referência descrito por Loeb & Quimby (1999). Os níveis de triglicérides e LDL-colesterol não foram diferentes estatisticamente entre os grupos experimentais (**Figura 4-B e Figura 4-D**). Do mesmo modo, Ayerza & Coates (2007) relataram que o consumo de dietas com 16 % de semente de chia triturada e 5 % de óleo de chia por ratos saudáveis no período de 30 dias não promoveu redução significativa nos níveis séricos de triglicérides e LDL-colesterol em comparação com a dieta controle.

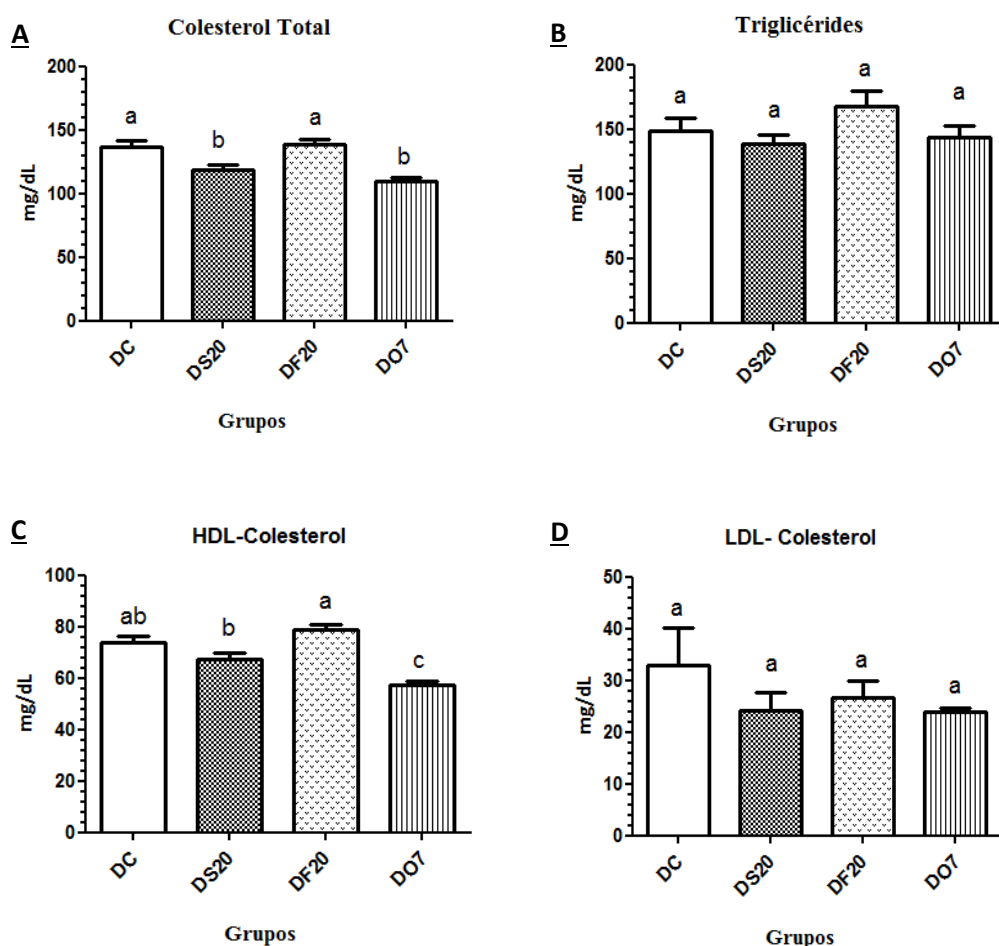


Figura 4. Níveis séricos de colesterol total (A), triglicérides (B), HDL-colesterol (C) e LDL-colesterol (D) dos grupos experimentais alimentados com dieta controle AIN-93M (DC), dieta AIN-93M contendo 20 % de semente de chia (DS20), 20 % de farinha fibrosa de chia (DF20) ou 7 % de óleo de chia (DO7) ao longo de 35 dias. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão dos grupos. One way ANOVA, seguido de teste de Tukey para comparação dos diferentes grupos ($p < 0,05$).

Wiesenfeld *et al.* (2003) demonstraram que não houve diferença estatística nos níveis de triglicérides em ratos que consumiram dieta com 20 % de semente de linhaça. Do mesmo modo, o consumo de dieta com óleo de perilla (*Perilla frutescens*) no decorrer de 20 dias não reduziu os níveis séricos de triglicérides em ratos (Ihara-Watanabe *et al.*, 1999).

Os níveis de colesterol sérico obtidos nos grupos experimentais estão de acordo com o intervalo de referência descrito por Loeb & Quimby (1999). Avaliando a o consumo das dietas experimentais, observa-se que os grupos que consumiram dieta contendo óleo (DO7) e semente (DS20) de chia apresentaram redução significativa nos níveis séricos de colesterol total em comparação com DC e DF20 (**Figura 4-A**).

O grupo de DF20 ($139,00 \pm 7,84$ mg/dL) não apresentou diferença significativa nos níveis de colesterol em comparação com o grupo DC ($136,60 \pm 10,52$ mg/dL). A redução nos níveis séricos de colesterol nos grupos DS20 ($119,00 \pm 7,87$ mg/dl) e DO7 ($109,60 \pm 6,46$ mg/dl), pode ter ocorrido devido ao maior consumo de ω 3-PUFA, especificamente o α -linolênico, e menor consumo de ácidos graxos saturados na dieta. Em comparação com o grupo DC, os grupos DO7 e DS20 apresentaram redução nos níveis de colesterol total de 19,76 % e 12,88 %, respectivamente.

Ayerza & Coates (2005) demonstraram que o consumo de dieta com 15 % de semente de chia triturada por ratos saudáveis no período de quatro semanas reduziu significativamente (11,31 %) os níveis de colesterol total sérico. Adicionalmente em outros estudos, investigadores reportaram que o consumo de dieta com 40 % de semente de linhaça (Wiesenfeld *et al.*, 2003) e 15 % de óleo de perilla (Ihara-Watanabe *et al.*, 1999) reduziram os níveis séricos de colesterol total em ratos.

O baixo consumo de ácidos graxos saturados contribuiu para redução dos níveis séricos de colesterol total, além disso, sugere-se que a elevada ingestão de ω 3-PUFA presente na dieta também colaborou nessa redução. De acordo com Martin *et al.* (2006) e Perini *et al.* (2010), os ω 3-PUFA são metabolizados pelos mesmos sistemas enzimáticos (alongase e dessaturase) que os ω 6-PUFA, no entanto, os passos de dessaturação nesta via são mostrados como sendo preferíveis aos ω 3-PUFA comparados com os ω 6-PUFA. Além disso, pesquisas *in vivo* demonstraram que o consumo de dietas com elevador teor de ω 3-PUFA, especificamente o ácido α -linolênico, tem reduzido os níveis séricos de colesterol total (Kim & Choi, 2001; Zhao *et al.*, 2004; *et al.*, Khalatbari Soltani *et al.* 2013; Dittrich *et al.*, 2015).

O colesterol é um componente crucial que mantém a fluidez e a permeabilidade da membrana celular nos vertebrados, sendo que o mesmo entra na circulação sanguínea de duas maneiras, através da absorção intestinal após digestão ou na síntese *de novo* do colesterol que é realizada principalmente pelo fígado (Ikonen, 2008; Sozen & Ozer, 2017). Durante a circulação, são transportados na forma de lipoproteínas, classificados de acordo com a sua densidade: quilomícrons, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL).

O HDL-colesterol e as moléculas envolvidas no seu metabolismo são fatores promotores da longevidade, pois existem vários mecanismos que podem explicar a associação entre o colesterol HDL e a sua funcionalidade. O HDL-colesterol é ateroprotetor através do seu transporte reverso de colesterol e proporciona efeitos anti-inflamatórios, antitrombóticos e de reparação de células endoteliais (Badimon & Vilahur, 2012; Choi *et al.*, 2017).

Com relação aos níveis de HDL-colesterol (**Figura 4-C**), os grupos DS20 e DF20 não apresentaram diferença estatística com relação ao grupo controle (DC), porém o grupo DO7 apresentou valor significativamente menor. O grupo DF20 ($78,86 \pm 4,29$ mg/dL) obteve maiores níveis HDL-colesterol em comparação com DS20 ($67,18 \pm 5,70$ mg/dL) e DO7 ($57,16 \pm 4,10$ mg/dL). Do mesmo modo, o grupo DS20 exibiu significativamente maiores níveis de HDL-colesterol em comparação com grupo DO7.

Os resultados desse estudo foram diferentes dos obtidos por Ayerza & Coates (2005; 2007), que relataram que o consumo de dieta com semente de chia triturada e com óleo de chia por ratos saudáveis no período de 30 dias promoveu aumento nos níveis séricos do HDL-colesterol em comparação com a dieta controle. Entretanto, os resultados do presente nesse estudo são similares aos encontrados em outras fontes de ω 3-PUFA. Ihara-Watanabe *et al.* (1999) relataram redução significativa nos níveis de HDL-colesterol nos animais que consumiram dieta com óleo de perilla. Wiesenfeld *et al.* (2003), observaram diferenças estatísticas nos níveis de HDL-colesterol em ratos que consumiram dieta com 20 % de semente de linhaça em relação ao controle.

De acordo com resultados obtidos na **Figura 4-C** e **Figura 4-D**, pode-se observar que os grupos DS20 e DF20 não apresentaram aumento nos níveis séricos de HDL-colesterol em comparação com o grupo DC, do mesmo modo os níveis séricos de LDL-colesterol não aumentaram. O HDL-colesterol participa do metabolismo do LDL-

colesterol fornecendo colesterol e recebendo apolipoteína-CII (APO-CII) e apolipoteína-E (APO-E), pois uma das principais funções do HDL-colesterol é armazenar APO-CII e APO-E para metabolismo de VLDL (Lima & Couto, 2006). O LDL é reconhecido pela apolipoteína-B100 e desta forma fornece colesterol para células hepáticas ou tecidos periféricos, controlando assim a enzima reguladora da síntese de colesterol. Como os níveis de LDL-colesterol não aumentaram, isso indica que há uma regulação dos índices enzimáticos e adequada endocitose do LDL por reconhecimento de receptores nos grupos DS20 e SF20.

Entretanto, a redução do HDL-colesterol no animais que consumiram dieta com 7 % óleo de chia (DO7) sugere-se estar relacionada ao elevado consumo do ácido graxo α -linolênico (ALA), pois o ALA pode suprimir a expressão da apolipoteína A-I (Ihara-Watanabe *et al.* (1999). A apolipoproteína A-I faz parte das frações lipoproteicas-HDL, sendo sintetizada no fígado e no intestino, agindo como cofator para a lecitina colesterol-aciltransferase (LCAT), atuando como ligante para o cassete ABCA-I (transportador que promove o fluxo de colesterol livre e fosfolípidos das células) e portanto, estando envolvida no transporte reverso do colesterol (Forti & Diamant, 2007).

3.3.4 Análise dos tecidos

3.3.4.1 Rins e coração

Os compostos fenólicos são associados à redução no risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares e crônicas, pela sua capacidade de sequestrar radicais livres e metais pró-oxidantes (Le Marchand, 2002; Jenkind *et al.*, 2003; Spencer *et al.*, 2008, Oliveira *et al.*, 2011).

Estudos têm mostrado que dietas ricas em cereais, grãos integrais e outras fontes de compostos fenólicos podem levar a um aumento da quantidade de antioxidantes no organismo (Cao *et al.*, 1998; Brian *et al.*, 2012). A atividade antioxidante dos rins e coração foi avaliada pelos métodos de ORAC e FRAP e não foi observada diferença significativa nos valores da atividade antioxidante entre os grupos experimentais (**Figura 5**).

O maior consumo de compostos fenólicos nos grupos que consumiram semente e farinha de chia não promoveu aumento da atividade antioxidante nos tecidos dos animais em comparação com o grupo controle (DC). Porém, para que os compostos fenólicos possam exercer a atividade biológica e aumentar a atividade antioxidante nos

tecidos, esses compostos devem estar em concentrações mínimas requeridas para que esse efeito biológico possa ocorrer. A dieta DS20 e DF20 não promoveram o aumento da atividade antioxidante nos tecidos possivelmente devido à baixa biodisponibilidade dos seus compostos fenólicos.

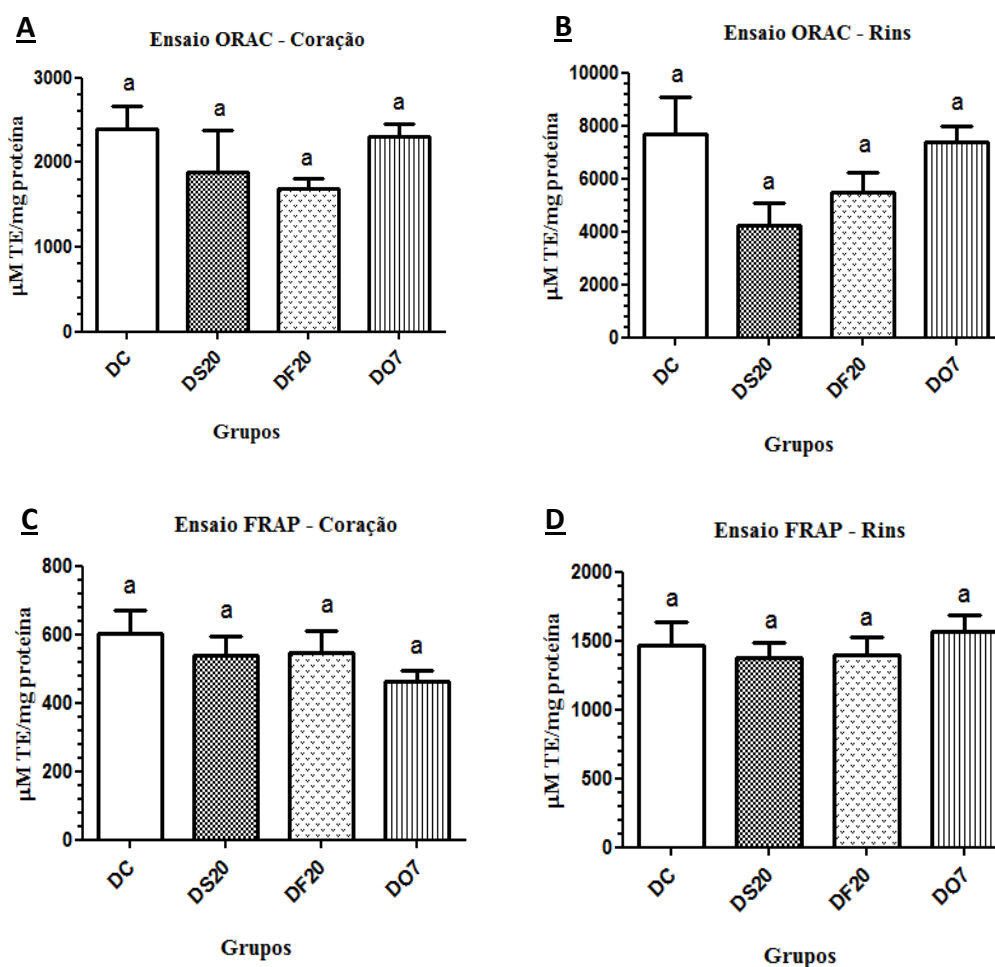


Figura 5. Atividade antioxidante avaliada por ensaio ORAC no coração (A) e nos rins (B), e ensaio FRAP no coração (C) e rins (D) dos grupos experimentais alimentados com dieta controle AIN-93M (DC), dieta AIN-93M contendo 20 % de semente de chia (DS20), 20 % de farinha fibrosa de chia (DF20) ou 7 % de óleo de chia (DO7) ao longo de 35 dias. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão dos grupos. One way ANOVA, seguido de teste de Tukey para comparação dos diferentes grupos ($p < 0,05$).

A classe majoritária dos compostos fenólicos presente na semente e farinha de chia são os ácidos fenólicos, sendo que os mesmos estão na sua maioria na forma ligada, ou seja na forma de ácidos fenólicos conjugados (Oliveira-Alves *et al.*, 2017).

Os ácidos fenólicos ligados têm uma biodisponibilidade muito baixa devido à matriz da semente dificultar o acesso das enzimas, tais como ferulates esterases e xilanases que atuam na liberação dos mesmos no trato gastrointestinal dos animais (Nystrom *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2014^a).

3.3.4.2 Fígado

O tipo e a quantidade de lipídeos ingeridos em uma dieta são os parâmetros que regulam a composição lipídica hepática (Jump *et al.*, 2005; Jump, 2008). Os lipídeos são macromoléculas importantes responsáveis pela estrutura da membrana celular e pelo fornecimento de energia, e incluem ácidos graxos, fosfolipídeos, colesterol e triglicérides neutros (Chen & Li, 2016).

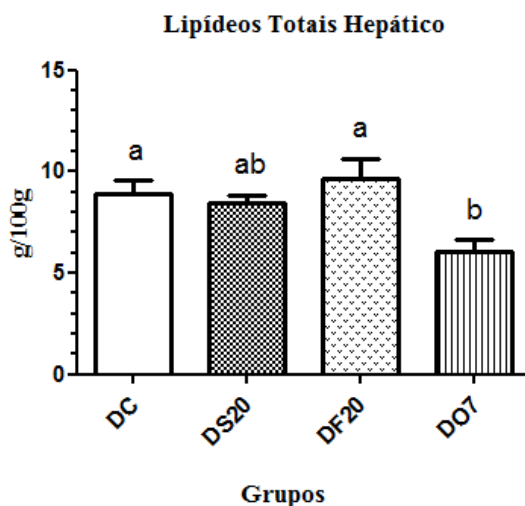


Figura 6. Lipídeos totais hepático dos animais alimentados com dieta controle AIN-93M (DC), dieta AIN-93M 20 % de semente de chia (DS20), 20 % de farinha fibrosa de chia (DF20) ou 7 % de óleo de chia (DO7) ao longo de 35 dias. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão dos grupos. One way ANOVA, seguido de teste de Tukey para comparação dos diferentes grupos ($p < 0,05$).

Os grupos, DC ($8,89 \pm 1,47$ g/100 g), DS20 ($8,42 \pm 0,83$ g/100 g) e DF20 ($9,66 \pm 2,20$ g/100 g) não apresentaram diferença significativa entre si quanto aos teores de lipídeos totais hepáticos. Entretanto, o grupo DO7 ($6,02 \pm 1,39$ g/100 g) exibiu redução significativa (32,28 %) nos teores de lipídeos hepáticos totais em relação aos grupos DC e DF20, porém não foi significativamente diferente do grupo DS20 (**Figura 6**). De acordo com os resultados obtidos, o maior consumo de PUFA presentes na dieta DO7 (76,98 %) promoveu redução do teores de lipídeos totais hepático nos animais, conforme **Tabela 1**.

No fígado dos roedores, os PUFA suprimem a expressão e a atividade da proteína de ligação do elemento de regulação dos esteróis-1c (SREBP-1c) e da proteína de ligação do elemento de resposta sensível aos carboidratos (ChREBP), fatores de transcrição chave para indução da expressão de genes relacionados à lipogênese. Além disso, este efeito é limitado aos PUFA, e não é observado para os ácidos graxos saturados e monoinsaturados (Nakamura *et al.*, 2014). As dietas ricas em ácido α -linolênico reduzem o acúmulo de lipídeos hepáticos tanto pela estimulação da β -oxidação como pela supressão da síntese de ácidos graxos (Murase *et al.*, 2005). Portanto, o consumo elevado de PUFA inibe a indução das enzimas lipogênicas diminuindo o teor de lipídeos totais hepático.

A **Tabela 8** demonstra o perfil e o conteúdo dos ácidos graxos na fração lipídica do fígado dos animais por grupo experimental. O grupo DO7 ($33,73 \pm 1,65$ g/100 g) apresentou aumento significativo nos teores de SFA no fígado em comparação com DC ($30,63 \pm 1,68$ g/100 g), SF20 ($30,01 \pm 1,73$ g/100 g) e DF20 ($30,62 \pm 2,16$ g/100 g). O aumento de 11 % nos teores de SFA no fígado dos camundongos alimentados com a dieta de 7 % de óleo de chia, em comparação com a dieta controle, ocorreu devido ao aumento nos teores do ácido palmítico (C16:0), margárico (C17:0), esteárico (C18:0) e araquídico (C20:0). Do mesmo modo, houve aumento significativo do ácido α -linolênico (C18:3) e redução significativa do ácido linoléico (C18:2) do grupo DO7 em relação ao grupo DC.

Os grupos experimentais que consumiram dietas com semente de chia e seus produtos não apresentaram diferença estatística entre si quanto ao conteúdo de MUFA no fígado, porém exibiram redução significativa em relação ao grupo DC ($26,67$ g/100 g $\pm 1,62$ g/100 g). A redução dos MUFA nos grupos DS20 ($20,09 \pm 2,83$ g/100 g), DF20 ($22,25 \pm 2,22$ g/100 g) e DO7 ($21,02 \pm 2,96$ g/100 g) ocorreu devido à redução no teor de ácido oléico (C18:1).

O grupo DS20 ($49,90 \pm 1,73$ g/100 g) apresentou maior conteúdo de PUFA em relação aos grupos experimentais, DC ($42,71 \pm 0,61$ g/100 g), DF20 ($47,14 \pm 1,40$ g/100 g) e DO7 ($45,26 \pm 3,05$ g/100 g). Os grupos DF20 e DO7 não foram significativamente diferentes, e apresentaram maior conteúdo de PUFA em comparação ao grupo controle. O aumento de 16,83 % nos teores de PUFA no fígado dos camundongos alimentados com a dieta DS20, em comparação com a dieta controle, foi devido ao aumento significativo no conteúdo do ácido α -linolênico ($15,38 \pm 0,91$ g/100 g). Com relação aos grupos DF20 e DO7, apesar de não apresentarem diferença

estatística com relação ao conteúdo de PUFA, o perfil dos ácidos graxos nesses grupos foi totalmente distinto. DF20 obteve elevado conteúdo de ácido linoléico ($35,26 \pm 1,26$ g/100 g) e baixo conteúdo de ácido α -linolênico ($6,09 \pm 1,05$ g/100 g), enquanto que DO7 exibiu menores conteúdos de ácido linoléico ($23,16 \pm 2,27$ g/100 g) e elevado conteúdo de ácido α -linolênico ($16,95 \pm 0,63$ g/100 g).

Tabela 8. Perfil e conteúdo dos ácidos graxos presentes na fração lipídica do fígado dos camundongos por grupos experimentais.

Ácido Graxos (g/100g)	DC	DS20	DF20	DO7
C14:0 - Mirístico	$0,46 \pm 0,11^b$	$0,59 \pm 0,09^a$	$0,43 \pm 0,06^b$	$0,45 \pm 0,09^b$
C16:0 - Palmítico	$21,68 \pm 0,84^a$	$18,19 \pm 0,44^b$	$21,23 \pm 0,24^a$	$21,92 \pm 0,21^a$
C16:1 - Palmitoléico	$2,10 \pm 0,25^a$	$1,85 \pm 0,11^b$	$2,09 \pm 0,67^a$	$2,31 \pm 0,74^a$
C17:0 - Margárico	$0,16 \pm 0,12^c$	$0,67 \pm 0,52^b$	$0,34 \pm 0,27^c$	$1,17 \pm 0,65^a$
C17:1 - Margaroleico	$0,12 \pm 0,03^b$	$0,15 \pm 0,05^b$	$0,17 \pm 0,06^b$	$0,46 \pm 0,07^a$
C18:0 - Esteárico	$8,14 \pm 0,13^b$	$9,66 \pm 0,22^a$	$7,94 \pm 0,17^b$	$9,54 \pm 0,21^a$
C18:1 - Oléico	$24,20 \pm 1,40^a$	$17,73 \pm 1,45^c$	$19,69 \pm 1,89^b$	$17,91 \pm 1,72^c$
C18:2 - Linoléico	$32,2 \pm 0,22^b$	$30,69 \pm 0,52^c$	$35,26 \pm 1,26^a$	$23,16 \pm 2,27^d$
C18:3 - α -Linolênico	$2,17 \pm 0,13^d$	$15,38 \pm 0,91^b$	$6,09 \pm 1,05^c$	$16,85 \pm 0,63^a$
C20:0 - Araquídico	$0,19 \pm 0,22^c$	$0,90 \pm 0,31^a$	$0,68 \pm 0,27^b$	$0,65 \pm 0,29^b$
C20:1 - Eicosenóico	$0,25 \pm 0,12^a$	$0,36 \pm 0,13^a$	$0,30 \pm 0,11^a$	$0,34 \pm 0,05^a$
C20:4 - Araquidônico	$0,75 \pm 0,15^b$	$1,20 \pm 0,31^a$	$1,13 \pm 0,27^a$	$1,01 \pm 0,21^a$
C20:5 - Timnodônico	$7,59 \pm 1,06^a$	$2,63 \pm 0,58^c$	$4,66 \pm 0,89^b$	$4,24 \pm 1,03^b$
SFA total	$30,63 \pm 1,68^b$	$30,01 \pm 1,73^b$	$30,62 \pm 2,16^b$	$33,73 \pm 1,65^a$
MUFA total	$26,67 \pm 1,62^a$	$20,09 \pm 2,83^b$	$22,25 \pm 2,22^b$	$21,02 \pm 2,96^b$
PUFA total	$42,71 \pm 0,61^c$	$49,90 \pm 1,73^a$	$47,14 \pm 1,40^b$	$45,26 \pm 3,05^b$

* Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

* Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

SFA = ácidos graxos saturados; MUFA = ácidos graxos monoinsaturados; PUFA = ácidos graxos poli-insaturados.

O grupo que consumiu dieta contendo 7 % de óleo de chia (DO7) demonstrou maior conteúdo do ácido α -linolênico e menor conteúdo do ácido linoléico no fígado, enquanto que o grupo que ingeriu dieta com 20 % semente de chia (DS20) exibiu maior conteúdo de PUFA, em comparação com a dieta controle.

Os resultados obtidos estão diretamente relacionados com perfil dos ácidos graxos presentes nas dietas, pois a dieta DO7 possui maior conteúdo do ácido α -linolênico em relação a DS20, 58,80 % e 50,39 %, respectivamente (**Tabela 1**).

Conclui-se que o elevado consumo de ω 3-PUFA na dieta alimentar contribui para o aumento do conteúdo de ω 3-PUFA no fígado, demonstrando que o ácido α -linolênico presente no óleo e na semente de chia estava biodisponível e foi incorporado no fígado dos camundongos de uma forma dependente da quantidade consumida na dieta.

Wiesenfeld *et al.* (2003) reportou o aumento significativo do conteúdo de ácido α -linolênico e redução do ácido linoléico no fígado dos ratos que consumiram dietas com 20 % e 40 % de semente de linhaça. Porém, os ratos que consumiram dieta com apenas 5 % de semente de chia no período de 8 semanas não apresentaram aumento no conteúdo de ácido α -linolênico (Poudyal *et al.*, 2012).

Os níveis de colesterol total e triglicérides hepático são apresentados na **Figura 7**.

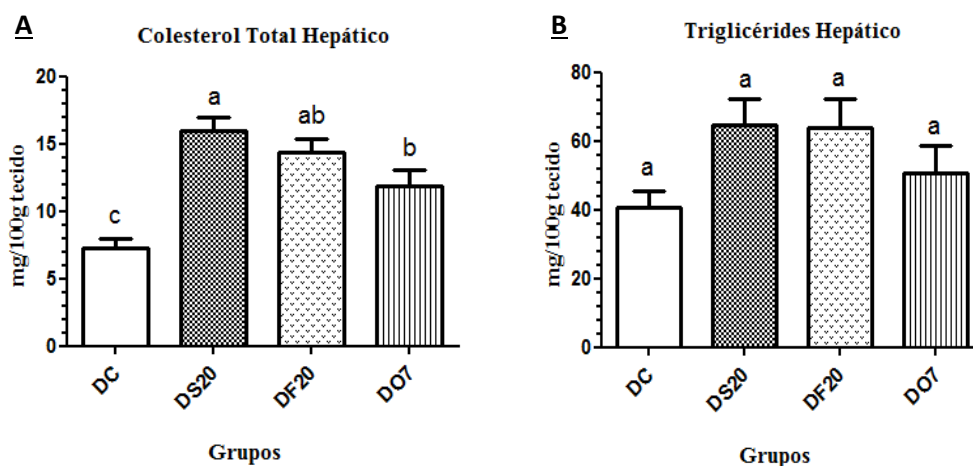


Figura 7. Colesterol total hepático (A) e Triglicérides hepático (B) dos grupos experimentais alimentados com dieta controle AIN-93M (DC), dieta AIN-93M contendo 20 % de semente de chia (DS20), 20 % de farinha fibrosa de chia (DF20) ou 7 % de óleo de chia (DO7) ao longo de 35 dias. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão dos grupos. One way ANOVA, seguido de teste de Tukey para comparação dos diferentes grupos ($p < 0,05$).

O grupo DC ($7,30 \pm 1,49$ mg/ 100g) que consumiu dieta com 7 % de óleo de soja, apresentou significativamente menores níveis de colesterol total hepático em comparação com os grupos experimentais que consumiram dieta com chia e seus produtos (DS20, DF20 e DO7). O grupo DF20 ($14,38 \pm 2,26$ mg/ 100g) não exibiu diferença significativa nos níveis de colesterol hepático com relação aos grupos DS20 ($15,99 \pm 2,17$ mg/ 100g) e DO7 ($11,86 \pm 2,62$ mg/ 100g). Entretanto, o grupo DO7

apresentou significativamente menores níveis de colesterol hepático em comparação com os grupos DS20 (**Figura 7-A**). A ingestão do óleo de chia com maior conteúdo de α -linolênico reduziu o colesterol total hepático em comparação com o grupo DS20.

Os níveis de triglicérides hepático não apresentaram diferença significativa entre os grupos (**Figura 7-B**). Portanto, de acordo com os resultados, conclui-se que o consumo de semente, farinha fibrosa e óleo de chia não reduziram os níveis de triglicérides hepáticos. Ihara-Watanabe *et al.* (1999) não obtiveram diferença significativa nos níveis de triglicérides hepáticos dos ratos que consumiram óleo de perilla.

4. CONCLUSÃO

A semente de chia é uma importante fonte lipídica, proteica, de fibras e de compostos fenólicos, e o seu óleo possui elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados, especificamente o ácido α -linolênico, além de baixo teor de ácidos graxos saturados. Os camundongos que consumiram dieta com 7 % de óleo e 20 % de semente apresentaram redução significativa nos níveis séricos de colesterol total, 19,76 % e 12,88 %, respectivamente em comparação com o grupo controle. Os níveis séricos de triglicérides e LDL-colesterol nos grupos que consumiram dieta com semente, farinha e óleo de chia não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle. A ingestão de dieta com 7 % de óleo de chia reduziu em 32,28 % o teor de lipídeos hepático em comparação com a dieta controle. Não houve redução nos teores de lipídeos hepático para os grupos que consumiram dieta com 20 % de semente e 20 % de farinha de chia. A composição dos ácidos graxos no tecido hepático dos animais apresentou significativamente elevado teor de ácido α -linolênico e um menor proporção dos ácidos graxos ($\omega 6/\omega 3$)-PUFA para os grupos que consumiram dieta com semente e óleo de chia. As dietas com 7 % de óleo de chia e 20 % de semente de chia diminuíram os níveis séricos de colesterol total e aumentaram o teor de ácidos graxos ω -3 no tecido hepático dos camundongos. De acordo com os resultados, podemos inferir que a semente e óleo de chia, nas concentrações estudadas, apresentaram efeito hipocolesterolêmico nos camundongos Balb/C saudáveis. Desta forma, conclui-se que a semente e óleo de chia são uma importante fonte de ω -3 e uma alternativa de consumo para contribuir na redução dos níveis séricos de colesterol total.

5. REFERÊNCIAS

- AOAC. (2006). Official Methods of Analysis of AOAC International 18th. Gaithersburg, AOAC International.
- AOCS. (2009). Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. AOCS Press, Champaign, USA.
- Araújo, F. T. M., Teixeira, A. C. P., Araújo, M. S. S., Silva, C. H., Negrão-Corrêa, D. A., Martins-Filho, O. A., Peruhype-Magalhães, V., Teixeira-Carvalho, A. (2015). Establishment of reference values for hematological and biochemical parameters of mice strains produced and biochemical parameters of mice strains produced in the animal facility at centro de pesquisas René Rachou/Fiocruz - Minas Gerais. *RESBCAL*, 3(2), 95–102.
- Atwater, W. O., & Bryant, A. P. (1900). The availability and fuel value of food materials. Washington, DC: US Government Printing Office, Agriculture Experiment Station, (12th Annual Report), 73–110.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2005). Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. *Nutrition Research*, 25.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2007). Effect of dietary α -linolenic fatty acid derived from chia when fed as ground seed, whole seed and oil on lipid content and fatty acid composition of rat plasma *Annals of Nutrition Metabolism*, 51, 27–34.
- Badimon, L., & Vilahur, G. (2012). LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1254, 18–32.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochemistry*, 239(1), 70–76.
- Bernaudo, F. S. R., & Rodrigues, T. C. (2013). Fibra alimentar – Ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, 57(6), 397–405.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *J Biochem. Physiol.*, 37(8), 911–917.
- Bodoira, R. M., Penci, M. C., Ribotta, P. D., & Martínez, M. L. (2017). Chia (*Salvia hispanica* L.) oil stability: study of the effect of natural antioxidants. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 107–113.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brasil - ANVISA (2003). RDC 360 - Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*.
- Brian, D., Craft, A. L., Kerrihard, R. A., & Ronald, B. (2012). Pegg phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Comprehensive Rev in Food Science and Food Safety*, 11.
- Cao, G., Booth, S. L., Sadowski, J. A., & Prior, R. L. (1998). Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am J Clin Nutr*, 68, 1081–1087.
- Chen, Y., & Li, P. (2016). Fatty acid metabolism and cancer development. *Sci. Bull.*, 61(19), 1473–1479.
- Choi, H., Kim, H. C., Stefani, K. M., Lee, J.-M., Yoon, Y. M., Lee, E. Y., Kim, K. M., Rhee, Y., Youm, Y., & Kim, C. O. (2017). Serum high-density lipoprotein

- cholesterol concentration and functional state: the korean urban rural elderly (KURE) study. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 71, 115–121.
- Dittrich, M., Jahreis, G., Bothor, K., Drechsel, C., Kiehntopf, M., Bluher, M., & Dawczynski, C. (2015). Benefits of foods supplemented with vegetable oils rich in alpha-linolenic, stearidonic or docosaheptaenoic acid in hypertriglyceridemic subjects: a double-blind, randomized, controlled trial. *Eur J Nutr.*, 54(6), 881–893.
- Emdin, M., Pompella, A., & Paolicchi, A. (2005). Gamma-glutamyltransferase, atherosclerosis, and cardiovascular disease: triggering oxidative stress within the plaque. *Circulation*, 112, 2078–2080.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G. H. A. (1957). A simple methods for the insolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497–507.
- Forti, N., & Diamant, J. (2007). Apolipoproteínas B e A-I: fatores de risco cardiovascular ? *Rev Assoc Med Bras*, 53(3), 276–282.
- Hara, H., Haga, S., Kasai, T., & Kiriya, S. (1998). Fermentation products of sugar-beet fiber by cecal bacteria lower plasma cholesterol concentration in rats. *J Nutr.*, 128(4), 688–693.
- Hartmann, L., & Lago, R. C. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practices*, 22(8), 475–476.
- Ho, H., Lee, A. S., Jovanovski, E., Jenkins, A. L., DeSouza, R., & Vuksan, V. (2013). Effect of whole and ground Salba seeds (*Salvia Hispanica* L.) on postprandial glycemia in healthy volunteers: a randomized controlled, dose-response trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 67, 786–788.
- Ihara-Watanabe, M., Umekawa, H., Takahashi, T., & Furuichi, Y. (1999). Effects of dietary alpha- or gamma-linolenic acid on levels and fatty acid compositions of serum and hepatic lipids, and activity and mRNA abundance of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 122, 213–220.
- Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9(2), 125–138.
- Jamra, M. (1941). Histologia, fisiologia e patologia do sistema retículo-endotelial *Ver. de Medicina*, Agosto, 21–30.
- Jenkins, D. J. A., Kendall, C. W. C., Marchie, A., Jenkins, A. L., Connelly, P. W., Jones, P. J. H. & Vuksan, V. (2003). The garden of eden-plant based diets, the genetic drive to conserve cholesterol and its implications for heart disease in the 21st century. *Comparative Biochem Physiol*, 136, 141–151.
- Jump, D. B. (2008). N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr Opin Lipidol.*, 19(3), 242–247.
- Jump, D. B., Botolin, D., Wang, Y., Xu, J., Christian, B., & Demeure, O. (2005). Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *J. Nutrition*, 135, 2503–2506.
- Kajihara, M., Okazaki, Y., Kato, S., Ishii, H., Kawakami, Y., Ikeda, Y., & Kuwana, M. (2007). Evaluation of platelet kinetics in patients with liver cirrhosis: similarity to idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Gastroenterol Hepatol.*, 22(1), 112–118.
- Khalatbari Soltani, S., Jamaluddin, R., Tabibi, H., Mohd Yusof, B. N., Atabak, S., Loh, S. P., & Rahmani, L. (2013). Effects of flaxseed consumption on systemic inflammation and serum lipid profile in hemodialysis patients with lipid abnormalities. *Hemodial Int*, 17, 275–28.

- Khan, M. Z., & He, L. (2017). The role of polyunsaturated fatty acids and GPR40 receptor in brain. *Neuropharmacology*, 113, 639–651.
- Kim, H. K., & Choi, H. (2001). Dietary alpha-linolenic acid lowers postprandial lipid levels with increase of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid contents in rat hepatic membrane. *Lipids*, 36, 1331–1336.
- Le Marchand, L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids – a review. *Biomed Pharmacotherapy*, 56, 296–301.
- Lima, E. S. & Couto, R. D. (2006). Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 42(3), 169–179.
- Loeb, W. F. and F. W. Quimby (1999). The Clinical Chemistry of Laboratory Animals. *Clinical Enzymology* 2 ed., 399–420.
- Marineli, R. S., Moraes, E. A., Lenquist, S. A., Godoy, A., T., Eberlin, M. N., & Marostica Jr., M. R. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *LWT- Food Sci. Technol.*, 59, 1304–1310.
- Marineli, R. S., Moura, C. S., Moraes, E. A., Lenquist, S. A., Lollo, P. C. B., Morato, P. N., Amaya-Farfan, J., & Marostica Jr., M. R. (2015). Chia (*Salvia hispanica* L.) enhances HSP, PGC-1 α expressions and improves glucose tolerance in diet-induced obese rats. *Nutrition*, 31, 740–748.
- Martin, C. A., Almeida, V. V., Ruiz, M. R., Visentainer, J. E. L., Matshushita, M., Nilson Evelázio de Souza, N. E., & Visentainer, J. V. (2006). Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev. Nutrição, Campinas*, 19(6), 761–770.
- Messamore, E., Almeida, D. M., Jandacek, R. J., & McNamara, R. K. (2017). Polyunsaturated fatty acids and recurrent mood disorders: phenomenology, mechanisms, and clinical application. *Progress in Lipid Research*, 66, 1–13.
- Murase, T., Aoki, M., & Tokimitsu, M. (2005). Supplementation with α -linolenic acid-rich diacylglycerol suppresses fatty liver formation accompanied by an up-regulation of β -oxidation in Zucker fatty rats. *Biochimica et Biophys Acta (BBA)-Molecular and Cell Biol of lipids*, 1733(2-3), 224–231.
- Nakamura, M. T., Yudell, B. E., & Loo, J. J. (2014). Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 53, 124–144.
- Nystrom, L., A., Paasonen, A., Lampi, A.-M., Piironen, V. (2007). Total plant sterols, steryl ferulates and steryl glycosides in milling fractions of wheat and rye. *J. of Cer. Science*, 45, 106–115.
- O'Connell, T. D., Block, R. C., Huang, S. P., & Shearer, G. C. (2017). ω 3-Polyunsaturated fatty acids for heart failure: effects of dose on efficacy and novel signaling through free fatty acid receptor. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 103, 74–92.
- OECD. (2002). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing *OECD Publishing*.
- Oliveira-Alves, S. C., Vendramini-Costa, D. B., Cazarin, C. B. B., Maróstica Jr., M. R., Ferreira, J. P. B., Silva, A. B., Prado, M. A., & Bronze, M. R. (2017). Characterization of phenolic compounds in chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, fiber flour and oil. *Food Chemistry*, 232, 295–305.
- Oliveira, D. M. and D. H. M. Bastos (2011). Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Quim. Nova*, 34(6), 1051–1056.
- Ou, B., Chang, T., Huang, D., & Prior, R. L. (2013). Determination of total antioxidant capacity by oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using fluorescein as the fluorescence probe: first action 2012.23. *Journal of AOAC International*, 96(6), 1372–1376.

- Perini, J. A. L., Stevanato, F. B., Sargi, S. C., Visentainer, J. E. L., Dalalio, M. M. O., Matshushita, M., Souza, N. E., & Visentainer, J. V. (2010). Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. *Rev. Nutr.*, 23(6), 1075–1086.
- Pizarro, M. L., Becerra, M., Sayago, A., Beltrán, M., & Beltrán, R. (2013). Comparison of different extraction methods to determine phenolic compounds in virgin olive oil. *Food Anal. Methods*, 6, 123–132.
- Poudyal, H., Panchal, S. K., Waanders, J., Ward, L., & Brown, L. (2012). Lipid redistribution by α -linolenic acid-rich chia seed inhibits stearoyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23, 153–162.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey Jr., G. C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 a rodent diet. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 123, 1939–1951.
- Reflotron (2010). *Manual de Instruções da Roche Diagnostics*. Roche Diagnostics.
- Renaud, H. J., Cui, J. Y., Lu, H., & Klaassen, C. D. (2014). Effect of diet on expression of genes involved in lipid metabolism, oxidative stress, and inflammation in mouse liver—insights into mechanisms of hepatic steatosis. *Plos One*, 9 (2), e88584.
- Richards, L. B., Li, M., van Esch, B. C. A. M., Garssen, J., & Folkerts, G. (2016). The effects of short-chain fatty acids on the cardiovascular system. *PharmaNutrition*, 4, 68–111.
- Rincón-Cervera, M. A., Valenzuela, R., Hernandez-Rodas, M. C., Barrera, C., Espinosa, A., Marambio, M., & Valenzuela, A. (2016). Vegetable oils rich in α linolenic acid increment hepatic n-3 LCPUFA, modulating the fatty acid metabolism and antioxidant response in rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 111, 25–35.
- Sivaprakasam, S., Prasad, P. D., & Singh, N. (2016). Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. *Pharmacology & Therapeutics*, 164, 144–151.
- Sozen, E., & Ozer, N. K. (2017). Impact of high cholesterol and endoplasmic reticulum stress on metabolic diseases: an updated mini-review. *Redox Biology*, 12, 456–461.
- Spencer, J. P. E., Abd El Mohsen, M. M, Minihaane, A. M & Mathers, J. C. (2008). Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *Br. J. Nutr.* , 99, 12–22.
- Subramani, S., Gajendren, S., Mahadevan, J., Jayachandran, M., Udaiyar, M., & Vinayagam, R. (2014). Ameliorating effect of eugenol on hyperglycemia by attenuating the key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem*, 385, 159–168.
- Swain, T., & Hillis, W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. — The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10(1), 63–68.
- Takashima, A., Fukuda, D., Tanaka, K., Higashikuni, Y., Hirata, Y., Nishimoto, S., Yagi, S., Yamada, H., Soeki, T., Wakatsuki, T., Taketani, Y., Shimabukuro, M., & Sata, M. (2016). Combination of n-3 polyunsaturated fatty acids reduces atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice by inhibiting macrophage activation. *Atherosclerosis*, 254, 142–150.

- Thrall, M. A. (2007). Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. *Editora Roca*, 1ª edição, 688.
- Timilsena, Y. P., Wang, B., Adhikari, R., & Adhikari, B. (2017). Advances in microencapsulation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs)-rich plant oils using complex coacervation: a review. *Food Hydrocolloids*, 69, 369–381.
- Valadares, M. C. (2006). Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste D150”. *Rev. Eletrônica de Farmácia*, 3(2), 93–98.
- Wang, T., He, F. & Chen, G.^a (2014). Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: a concise review. *J. of Funct. Foods*, 7, 101–111.
- Wang, W., Zhu, J., Lyua, F., Panigrahy, D., Ferrara, K. W., Hammock, B., & Zhang, G. (2014). ω -3 Polyunsaturated fatty acids-derived lipid metabolites on angiogenesis, inflammation and cancer. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 113–115, 13–20.
- Wiesenfeld, P. W., Babu, U. S., Collins, T. F. X., Sprando, R., O'Donnell, M. W., Flynn, T. J., Black, T., & Olejnik, N. (2003). Flaxseed increased α -linolenic and eicosapentaenoic acid and decreased arachidonic acid in serum and tissues of rat dams and offspring. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 841–855.
- Zhao, G., Etherton, T. D., Martin, K. R., West, S. G., Gillies, P. J., & Kris-Etherton, P. M. (2004). Dietary α -linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. *J Nutr.*, 134, 2991–2997.

CAPÍTULO IV

EFEITO DA SEMENTE E FARINHA FIBROSA DE CHIA (*Salvia hispanica* L.) NO DESENVOLVIMENTO DO TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS

CAPÍTULO IV

EFEITO DA SEMENTE E FARINHA FIBROSA DE CHIA (*Salvia hispanica* L.) NO DESENVOLVIMENTO DO TUMOR SÓLIDO DE EHRlich EM CAMUNDONGOS

Sheila Cristina de Oliveira Alves¹, Daniel Barrera Arellano³, Renato Grimaldi³, Marcella Stahl³, Mário Roberto Maróstica Júnior⁴, Cinthia Baú Betim Cazarin⁴, Eduardo Augusto Rabelo Socca⁵, Wagner José Favaro⁵, Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz⁶, Fabiana Regina Nonato⁶, Thais Petrochelli Banzato⁶, Karin Maia Monteiro⁶, Sirlene Valerio Tinti⁶, João Ernesto de Carvalho⁶, Débora Barbosa Vendramini-Costa², Marcelo Alexandre Prado¹

¹*Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brasil.*

²*Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-970, Campinas, SP, Brasil.*

³*Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brasil.*

⁴*Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brasil.*

⁵*Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-865, Campinas, SP, Brasil.*

⁶*Divisão de Farmacologia e Toxicologia, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP), 13081-970, Campinas, SP, Brasil.*

* Autor para correspondência: sheilacris@yahoo.com.br

Fone: (19) 3521-0081

Colaborador: mpradofea@gmail.com

Manuscrito será submetido para o periódico Journal of Nutritional Biochemistry.

RESUMO

As sementes de chia apresentam elevados teores de ω 3-PUFA, fibras alimentares e compostos fenólicos. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da ingestão de dieta contendo 10 %, 15 % e 20 % de semente e farinha fibrosa de chia no desenvolvimento do tumor sólido de Ehrlich. Quarenta e oito camundongos Balb/C machos foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos (n=6): o grupo controle e o grupo tratado com doxorrubicina foram alimentados com a dieta do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93M), e demais grupos foram alimentados com suas respectivas dietas AIN-93M com adição de 10 %, 15 % e 20 % de semente ou farinha fibrosa de chia, no período de 56 dias. A massa tumoral e a histopatologia foram analisadas para avaliar a eficácia do consumo de chia na redução do crescimento tumoral, enquanto que a toxicidade foi determinada pela massa relativa dos tecidos, parâmetros bioquímicos e hematológicos. O consumo da semente de chia na dieta diminuiu o crescimento da massa tumoral no modelo de tumor sólido de Ehrlich. De acordo com os resultados, os animais tratados com as dietas contendo 10 %, 15 % e 20 % de semente de chia e 20 % de farinha fibrosa de chia apresentaram tumores menores, com redução média de 24 % na massa tumoral em comparação com o grupo controle. O consumo diário de dieta contendo semente e farinha fibrosa de chia não promoveu sinais de toxicidade, diferente do grupo tratado com doxorrubicina, que promoveu alterações nos parâmetros hematológicos. Conclui-se que o consumo de semente de chia na dieta, especialmente contendo 10 %, 15 % e 20 % de semente, possui ação preventiva no crescimento tumoral, não apresentando efeitos colaterais. Um dos grandes desafios no controle do câncer é a busca por novos agentes preventivos, bem aceitos e de fácil acesso à população, desejavelmente sem efeitos colaterais. A semente de chia certamente representa um potencial a ser explorado e estudos futuros serão realizados a fim de confirmar seu potencial preventivo em modelos crônicos de carcinogênese.

Palavras Chave: *Salvia hispanica*; ácidos graxos; compostos fenólicos; tumor sólido de Ehrlich; prevenção.

ABSTRACT

Chia seeds present high levels of ω 3-PUFA, dietary fibers and phenolic compounds. The objective of this study was to evaluate the effects of the intake of diets containing 10 %, 15 % and 20 % of seed and fibrous chia flour in the development of Ehrlich solid tumors. Forty-eight male Balb/C mice were randomized divided into eight groups (n = 6): the control group and the doxorubicin group were fed with the American Institute of Nutrition (AIN-93M) diet, and other groups were fed with their respective AIN-93M diets added with 10 %, 15 % and 20 % of seed or fibrous flour of chia, during a period of 56 days. Tumor mass and histopathology were analyzed to evaluate the efficacy of chia consumption in reducing tumor growth, while toxicity was determined by the relative mass of the tissues, biochemical and hematological parameters. The consumption of chia seed in the diet decreased tumor growth in the Ehrlich solid tumor model. According to the results, the animals treated with diets containing 10 %, 15 % and 20 % of chia seed and 20 % of chia fibrous flour presented smaller tumors, with average reduction 24 % in tumor mass compared to the control group. Daily consumption of diet containing chia seed and fibrous flour did not demonstrate signs of toxicity, unlike the doxorubicin group, which showed changes in hematological parameters. Thus, it can be concluded that the regular consumption of chia seed in the diet, especially containing 10 %, 15 % and 20 % of seed, has preventive action against the tumor growth, with no side effects. One of the great challenges in the control of cancer is the search for new preventive agents, that are well accepted and easily accessible to the population, desirably without side effects. Chia seed certainly has great potential to be explored and future studies will be carried out to confirm its potential preventive action in chronic models of carcinogenesis.

Keywords: *Salvia hispanica*, fatty acids, phenolic compounds, ehrlich solid tumor, prevention.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, pesquisadores reconhecem amplamente que o risco de desenvolver diferentes tipos de câncer pode ser influenciado pela dieta alimentar, uma vez que estimativas sugerem que cerca de um terço de todos os cânceres humanos podem ser associados à uma dieta inadequada (Garcia & Winter, 2017). Sendo assim, mudanças para uma dieta saudável poderiam reduzir significativamente as taxas de certos tipos de câncer. Estudos têm relatado que dietas com elevados teores de compostos fenólicos e ácidos graxos ω -3 poli-insaturados (ω 3-PUFA) podem reduzir os riscos de desenvolvimento de câncer (Prasad *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017).

O consumo dos compostos fenólicos presentes em frutas, cereais e sementes oleaginosas tem atraído a atenção de pesquisadores, nutricionistas e engenheiros de alimentos, pois as suas propriedades antioxidantes e ações biológicas específicas apresentam efeitos na prevenção de várias doenças associadas ao stresse oxidativo, tais como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer em modelos de estudos epidemiológicos *in vitro* e *in vivo* (Roleira *et al.*, 2015). Do mesmo modo, as propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumoral dos ω 3-PUFA têm sido reportadas em muitos estudos investigativos *in vivo* (Wang *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2017).

Entretanto, a maioria dos estudos têm analisado os nutrientes individualmente, tais como os composto fenólicos e ω 3-PUFA, ignorando a complexidade das dietas, e desse modo excluindo a oportunidade de estudar a sinergia entre os nutrientes presentes nos alimentos (Masana *et al.*, 2017). Portanto, tem sido crescente o interesse em analisar a semente de chia, devido aos seus benefícios nutricionais, os quais têm sido reconhecidos em alguns de seus componentes, entre eles o seu elevado teor de ácidos graxos ω 3-PUFA, e baixa teor de ácidos graxos saturados (Porrás-Loaiza *et al.*, 2014), além da presença de compostos fenólicos com alta atividade eletroquímica, tais como danshensu, ácido caféico e ácido rosmarínico (Oliveira-Alves *et al.*, 2017).

Estudos recentes relatam que a ingestão diária de componentes bioativos, entre eles os compostos fenólicos e ácidos graxos poli-insaturados, presentes nas sementes de chia, promoveram redução de doenças cardiovasculares (Ayerza & Coates, 2007; Croft, 2016), efeito hepatoprotetor (Poudyal *et al.*, 2012), controle da diabetes (Ho *et al.*, 2013) e efeito protetor contra doenças relacionadas à obesidade (Marineli *et al.*, 2015).

A busca por agentes preventivos e terapêuticos, na prevenção e controle do câncer, ainda representa um desafio, devido às características peculiares de cada tipo de câncer, mecanismos de resistência e a indução de efeitos colaterais pelos tratamentos usados na clínica (Vendramini-Costa *et al.*, 2017). Portanto, a busca por novos agentes preventivos, especialmente os de fácil acesso, tais como os agentes incorporados à dieta, se faz necessário, e neste contexto a semente de chia representa uma alternativa promissora.

Neste estudo avaliamos o efeito da semente e farinha fibrosa de chia incorporado à dieta, contendo várias proporções de ($\omega 6/\omega 3$)-PUFA e compostos fenólicos, em um ensaio *in vivo* com modelo de tumor sólido de Ehrlich, adenocarcinoma mamário murino, caracterizado por crescimento rápido (Oloris *et al.*, 2002)

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados para caracterização das dietas foram o ácido clorídrico e metanol adquiridos da Chemco (Campinas, SP, Brasil); ácido sulfúrico concentrado, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, isopropanol e reagente Folin-Ciocalteu's da Dinâmica (Diadema, SP, Brasil); ácido bórico, carbonato de sódio, sulfato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de amônio, clorofórmio, acetona e éter de petróleo da Synth (Diadema, SP, Brasil). O ácido gálico foi obtido da Sigma-Aldrich (Sigma Co., St. Louis, MO. USA). O hexano grau HPLC (Macron, EUA) e ésteres metílicos do C₄ ao C₂₄ (FAME Mix, Supelco, EUA). O fármaco, cloridrato de doxorrubicina (50mg), foi adquirido da Europharma.

2.2 Equipamentos

Balança analítica (Marca BEL, São Paulo, SP, Brasil), balança analítica (Shimadzu, Modelo AY220, Barueri, SP, Brasil), estufa de secagem industrial (Nova Técnica, Modelo NT513, Piracicaba, SP, Brasil), agitador de tubos (Labnet, modelo S0200, EUA), bloco digestor (Marconi, MA 4025, Piracicaba, SP, Brasil), destilador de nitrogênio (Tecnal, TE 40-25, Piracicaba, SP, Brasil), analisador hematológico (PocH-100 iv Diff, Curitiba, PR, Brasil), microcentrífuga para eppendorf (Eppendorf North America, modelo 5415C, Westbury, USA), analisador bioquímico automatizado Reflotron plus (Roche, Modelo Reflotron plus, EUA), leitor de microplacas (Synergy

HT, Biotek, Winooski, USA), cromatógrafo gasoso capilar (CGC Agilent 6850, EUA), micrótomo rotativo Biocut 1130 (Reichert-Jung, Munique, Alemanha) e microscópio óptico acoplado à uma câmera de vídeo (Leica DM2500, Wetzlar, Alemanha). Os experimentos *in vivo*, as análises hematológicas e bioquímicas foram realizados na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP). As análises histológicas do tumor foram realizadas no Departamento de Biologia Estrutural e Funcional (Instituto de Biologia, UNICAMP). As análises de caracterização das dietas e dos tecidos dos animais foram realizadas na Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA/ UNICAMP).

2.3 Animais

Os experimentos foram realizados em camundongos Balb/C machos obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica-UNICAMP (CEMIB) com 4 semanas de idade. Os camundongos Balb/C (20-30 g) foram mantidos no biotério da Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/UNICAMP, em salas com temperatura controlada de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de 50 a 60 % ± 5 %, em ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso livre à água e ração. Os cuidados dos animais e os protocolos de pesquisa estão de acordo com os princípios e diretrizes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo comitê de ética em pesquisa animal do Instituto de Biologia – UNICAMP (nº. 3192-1), conforme o **Anexo 1**.

2.4 Elaboração das dietas

As dietas foram elaboradas de acordo com *American Institute of Nutrition* (Reeves *et al.*, 1993). Os ingredientes foram adquiridos da Rhoester Indústria e Comércio Ltda (Araçoiaba da Serra, SP, Brasil). A dieta AIN-93M foi modificada para os teores de proteínas de 18 % e lipídeos de 7 %. Após a preparação, as dietas foram embaladas em sacos escuros de polietileno e armazenadas a -20°C . As dietas elaboradas foram a AIN-93M como a dieta controle (DC), AIN-93M com 10 % de semente de chia (DS10), AIN-93M com 15 % de semente de chia (DS15), AIN-93M com 20 % de semente de chia (DS20), AIN-93M com 10% de farinha fibrosa de chia (DF10), AIN-93M com 15 % de farinha fibrosa de chia (DF15) e AIN-93M com 20 % de farinha fibrosa de chia (DF20).

2.5 Análises das dietas

2.5.1 Composição centesimal

A composição centesimal das dietas foi determinada quanto ao teor de umidade, cinzas, proteínas (AOAC, 2006) e lipídeos (Bligh & Dyer, 1959). O teor de carboidratos foi calculado por diferença, de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 360 (BRASIL, 2003). O valor de energia foi obtido utilizando-se o fator de Atwater (Atwater & Bryant, 1900).

2.5.2 Perfil dos ácidos graxos

As extrações lipídicas das dietas foram realizadas segundo o método de Bligh & Dyer (1959), utilizando agitador de tubos (Labnet, modelo S0200, EUA). A composição dos ácidos graxos presentes na fração lipídica de cada dieta foi determinada por cromatografia gasosa, após esterificação, utilizando a metodologia descrita por Hartmann & Lago (1973). Os ésteres metílicos foram separados segundo o método AOCS Ce 2-66 (2009), analisados em cromatógrafo gasoso capilar (marca CGC Agilent, 6850 Series GC System) com detector de ionização de chama.

Os componentes foram separados em coluna capilar de sílica fundida DB-23 Agilent (50 % cianopropil metil polisiloxano modificado), com dimensões de 60 m, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 0,25 µm. As condições de operação foram fluxo de 1,00 mL/min, temperatura programada do detector de 280 °C, temperatura do injetor a 250 °C, temperatura do forno: 110 °C – 5 min.; 110 – 215 °C – 5 min, 215 °C – 24 min., gás de arraste: hélio; velocidade linear do gás de arraste de 24 cm/s, volume injetado de 1,0 µL. A identificação e quantificação dos ácidos graxos foi realizada através da comparação do tempo de retenção dos ácidos graxos das amostras com dos padrões. As análises cromatográficas foram realizadas em duplicata.

2.6 Compostos fenólicos totais na semente e farinha de chia

2.6.1 Extração dos compostos fenólicos

As sementes de chia foram trituradas em moinho (A11 basic BS32 IKA Mill, São Paulo, SP, Brasil) para obtenção da semente de chia triturada. Utilizou-se o método de extração por ultrassom (USE) para extração dos compostos fenólicos (Pizarro *et al.*, 2013). Pesou-se aproximadamente 2 g de farinha (semente de chia triturada ou farinha fibrosa) em seguida foi adicionado 6 mL de solução metanol:água (80:20, v/v) e a amostra foi homogeneizada. Após a agitação em vórtex durante 10 s, as

amostras foram colocadas imediatamente no banho de ultrassom (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). As extrações foram realizadas a 25 kHz de frequência e 160 W de potência, durante 60 min a $25 \pm 3^\circ\text{C}$. Depois, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm durante 30 min e o sobrenadante removido do resíduo.

No resíduo foi adicionado 6 mL de solução metanol:água (80:20, v/v), sendo realizado a agitação em vórtex durante 10 s, e as amostras foram colocadas novamente no banho de ultrassom durante 60 min a $25 \pm 3^\circ\text{C}$. Depois, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm durante 30 min e o sobrenadante 2 foi removido. Os sobrenadantes foram combinados e evaporados até a secura na temperatura de $40 \pm 1^\circ\text{C}$ sob pressão reduzida (Evaporador rotativo Fisatom 801, São Paulo, SP, Brasil). O resíduo seco foi dissolvido em 2 mL de metanol:água (80:20, v/v), filtrado através de uma membrana de PVDF de $0,22\ \mu\text{m}$ (Millipore, EUA), obtendo assim os extratos hidrofílicos da semente e farinha fibrosa, os quais foram armazenados a -18°C até a análise. Todas as amostras foram extraídas em triplicata.

2.6.2 Determinação do conteúdo fenólico total

O conteúdo fenólico total da semente e farinha fibrosa (extratos metanólicos) foi determinado de acordo com o método de Folin-Ciocalteu's (Swain & Hillis, 1959). Resumidamente, foram misturados 50 μL de extrato, 800 μL de água destilada e 25 μL (0,25 N) de reagente de Folin-Ciocalteu e incubados à temperatura ambiente durante 3 min. Em seguida, adicionou-se 100 μL de solução de carbonato de sódio (1 N) e incubou-se ainda durante 2 hs à temperatura ambiente em ambiente escuro. A absorvância foi lida a 725 nm em leitor de microplacas (SynergyHT, Biotek, Winooski, EUA). O ácido gálico foi utilizado para quantificação e os resultados foram expressos em termos de equivalente de ácido gálico (mg GAE/g chia). Todas as medidas foram realizadas em triplicata para cada amostra analisada.

2.7 Determinação de fibra solúvel e insolúvel na semente e farinha de chia

O conteúdo de fibra alimentar solúvel e insolúvel foi determinado de acordo com o método enzimático-gravimétrico (AOAC, 2006). O conteúdo de fibra alimentar total foi calculado a partir da soma dos valores obtidos de fibra alimentar solúvel e insolúvel.

2.8 Tumor sólido de Ehrlich

2.8.1 Preparação das células

As células de tumor de Ehrlich foram mantidas na sua forma ascítica, no peritônio dos camundongos, por passagens semanais com 5×10^5 células/animal. As células foram descongeladas, ressuspensas em PBS e centrifugadas por 5 minutos a 2500 rpm (*Centrifuge* 5403, Eppendorf, EUA) a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular novamente ressuspendido em PBS, em volume suficiente para preparar a suspensão celular na densidade de inoculação de 5×10^5 células/animal. Dois animais foram inoculados (doadores) e, após cinco ou seis dias, foram sacrificados, o líquido ascítico foi coletado e submetido a processamento, para preparo da suspensão de manutenção da linhagem ou para preparo da suspensão de trabalho (Gomes *et al.*, 2008; Vendramini-Costa *et al.*, 2010).

2.8.2 Inoculação das células tumorais no dorso dos animais

Para realização dos experimentos foram utilizados 48 camundongos machos da linhagem BALB/c (n=6/ por grupo). Quarenta e oito animais foram divididos aleatoriamente em oito grupos: dieta AIN-93M como controle (DC), dieta doxo (dieta DC com tratamento com doxorubicina – Europharma 3 mg/kg - DCDX), os grupos com as dietas AIN-93M adicionadas de 10 % (DS10), 15 % (DS15) ou 20 % (DS20) de semente de chia, e os grupos com as dietas AIN-93M com 10 % (DF10), 15 % (DF15) ou 20 % (DF20) de farinha fibrosa de chia. Portanto, os animais foram pré-alimentados com as dietas por 35 dias antes do inóculo das células. No 36º dia as células foram preparadas na densidade de 5×10^6 células/animal, em PBS com pH 7, e inoculadas (60 µL/animal) no tecido celular subcutâneo do dorso do animal (flanco), de acordo com Iwamoto *et al.* (2015).

As dietas foram mantidas ao longo do experimento. A massa corporal foi determinada através da pesagem dos animais a cada três dias desde da introdução das dietas. A partir do 39º dia os animais do grupo DCDX foram tratados intraperitonealmente a cada três dias com a doxorubicina (3 mg/kg). No 56º dia, os camundongos foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia para a retirada do tumor e dos tecidos (rins, fígado, baço, coração e pulmão), que foram pesados e avaliados macroscopicamente. Os fígados foram armazenados em ultrafreezer (Revco, ULT1386-3-D36, Asheville, EUA) para posterior análises. Os tumores foram armazenados em solução de formol tamponada neutra a 10 % para posterior análise.

2.9 Delineamento experimental antitumoral

Foram utilizados grupos experimentais para avaliar a atividade antitumoral da semente e farinha fibrosa de chia em camundongos Balb/C machos (**Figura 1**). No experimento foram utilizados 54 camundongos machos da linhagem BALB/c (n=6/ por grupo). O ensaio antitumoral utilizou 48 camundongos que foram aleatoriamente divididos em oito grupos (n=6/ por grupo), sendo que os animais receberam as seguintes dietas:

A) Ensaio Sadio:

- Grupo sadio: Dieta controle (DC Sadio) – dieta padrão controle AIN-93M;

B) Ensaio Tumoral:

- Grupo I: Dieta controle (DC) – dieta AIN-93M;
- Grupo II: Dieta controle (DC) com tratamento quimioterápico (DCDX) – dieta AIN-93M com o tratamento de doxorrubicina (3 mg/kg) tratados intraperitonealmente a partir da inoculação das células tumorais (36º dia);
- Grupo III: Dieta com semente de chia (DS10) – dieta AIN-93M com adição de 10 % (m/m) de semente de chia triturada;
- Grupo IV: Dieta com semente de chia (DS15) – dieta AIN-93M com adição de 15 % (m/m) de semente de chia triturada;
- Grupo V: Dieta com semente de chia (DS20) – dieta AIN-93M com adição de 20 % (m/m) de semente de chia triturada;
- Grupo VI: Dieta com farinha fibrosa de chia (DF10) – dieta AIN-93M com adição de 10 % (m/m) de farinha fibrosa de chia.
- Grupo VII: Dieta com farinha fibrosa de chia (DF15) – dieta AIN-93M com adição de 15 % (m/m) de farinha fibrosa de chia.
- Grupo VIII: Dieta com farinha fibrosa de chia (DF20) – dieta AIN-93M com adição de 20 % (m/m) de farinha fibrosa de chia.

O grupo controle sadio (n=6) foi alimentado com dieta controle (DC) no período de 56 dias sem inoculação do tumor, apenas para uso como referência para avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos grupos com tumor sólido de Ehrlich.

O experimento *in vivo* foi realizado no período total de 56 dias no biotério da Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/UNICAMP, em salas com temperatura controlada de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 50 a 60 % $\pm$ 5 %, e em ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso livre à água e dieta.

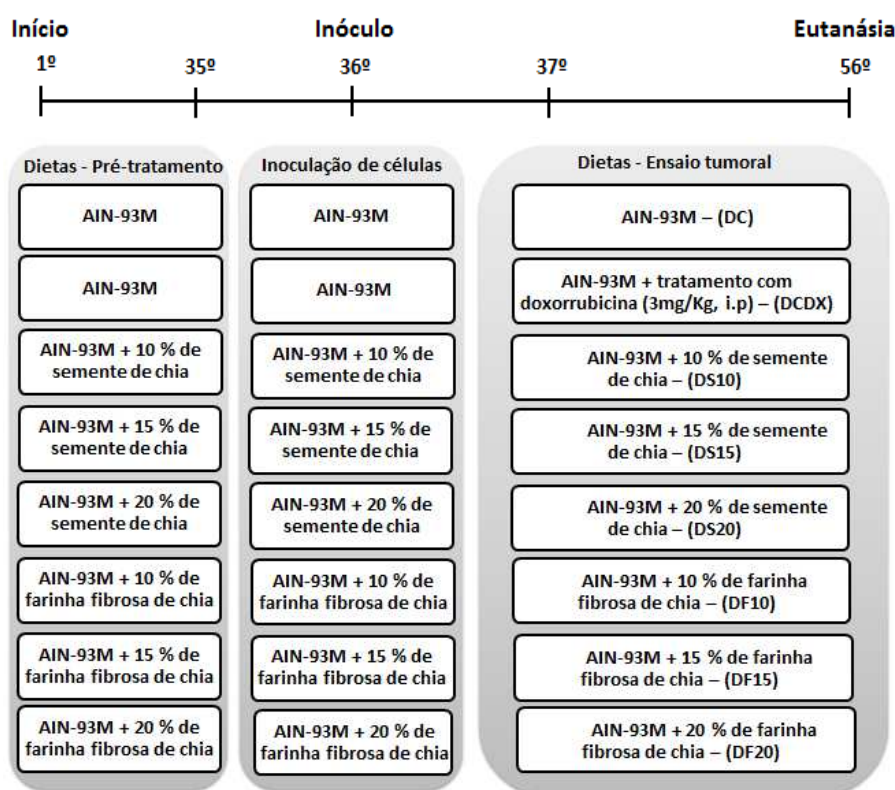


Figura 1. Esquema ilustrativo do ensaio tumoral.

2.10 Avaliações dos animais

2.10.1 Massa corporal

A quantidade de dieta consumida por cada grupo experimental foi avaliada por meio do registro diário da ingestão alimentar dos animais (variação entre a oferta e as sobras da dieta deixadas nas caixas) durante os 56 dias de ensaio, para obtenção da ingestão média nos diferentes grupos. Durante todo período experimental, os animais foram submetidos semanalmente à avaliação da massa corporal a fim de minimizar a manipulação e estresse dos animais.

2.11 Eutanásia dos animais

No final do período experimental, após jejum de 8 horas, todos os animais foram pesados, anestesiados (100 mg/kg ketamina + 5mg/kg xilazina). Em seguida o sangue foi coletado por punção cardíaca e os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento de anestesia. O sangue de cada animal foi distribuído em microtubo de 0,5 mL contendo 10 µL de anticoagulante EDTA sódico a 10 % para realização dos parâmetros hematológicos e em um microtubo de 1,0 mL sem EDTA para centrifugação do soro e posterior realização das análises bioquímicas.

2.11.1 Avaliação dos parâmetros sanguíneos

O sangue coletado em microtubos com EDTA (0,5 mL de sangue para 10 µL de EDTA) foi lido em aparelho veterinário para análise de hemograma (Sysmex, modelo pocH-100iV, Curitiba, PR, Brasil), avaliando-se: leucócitos totais (WBC), eritrócitos (RBC), hemoglobina (HGB), hematócitos (HCT) e plaquetas (PLT).

2.11.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

A determinação dos parâmetros bioquímicos foi realizada no soro, portanto os microtubos de 1,0 mL foram centrifugados durante 15 min a 3500 rpm, o sobrenadante (soro) foi coletado em microtubo e armazenado a 10 °C para posterior análise. Os parâmetros bioquímicos foram dosados através do analisador automatizado Reflotron (Roche, Reflotron plus, EUA), empregando o método cinético UV, utilizando *kits* comerciais de reagentes padrão (Roche, EUA). Todas as medidas de atividade enzimática foram visualizadas para a temperatura 37 °C. Uma alíquota de 30 µL de soro de cada animal foi inserida no centro da zona vermelha reativa da tira, removendo anteriormente a banda protetora. Após 15 s a tira foi introduzida horizontalmente no aparelho e o aparecimento no visor confirma que a leitura do código magnético específico do teste. Os parâmetros bioquímicos analisados foram gama-glutamilttransferase (GGT), aspartato aminotransferase (TGO), alanina aminotransferase (TGP) e fosfatase alcalina (ALP).

2.11.3 Peso relativo dos tecidos

Após eutanásia, cada animal, foi excisado e os seguintes tecidos (coração, fígado, rins, baço e pulmão) foram retirados e pesados em balança analítica. Os fígados

foram separados em frascos, identificados e armazenados em ultrafreezer (Revco, ULT1386-3-D36, Asheville, EUA) para análises posteriores.

2.11.4 Análises histológicas do tumor

Os tumores dos animais dos grupos experimentais foram removidos e armazenados em solução de formol tamponado a 10 % por 24 horas, após esse período, seguiu-se a desidratação progressiva com série crescente de etanol: etanol 70°, etanol 80°, etanol 100°, xilol e inclusão em parafina. Os cortes foram realizados no micrótomo rotativo Biocut 1130 (Reichert-Jung, Munique, Alemanha), 5 µm de espessura. Para a coloração, os cortes foram desparafinizados em série de xilol e reidratados em concentrações decrescentes de etanol. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para análise das áreas de necrose na massa tumoral.

2.11.4.1 Área de necrose

Utilizou-se o sistema de análise de imagens computadorizado (Leica LAS X Core, Wetzlar, Alemanha) para avaliação da área de necrose no Laboratório do Instituto de Biologia da UNICAMP. Esse sistema compõe-se de um microscópio óptico acoplado à uma câmera de video (Leica DM2500, Wetzlar, Alemanha) e um computador com placa digitalizadora. As áreas de necrose em meio a massa tumoral foram observadas no microscópio utilizando objetivas de 10x e 50x. A área de necrose foi quantificada utilizando-se o *software* ImageJ 1.46r (Bethesda, Maryland, USA) por meio da equação [% área de necrose = (área de necrose/ área total (área de necrose + área de tumor)) *100].

2.11.5 Análises hepáticas

2.11.5.1 Teor de lipídeos totais

O teor de lipídeos totais do fígado dos animais foi determinado utilizando a metodologia de extração de lipídeos totais em tecido animal (Folch *et al.*, 1957) em triplicata. Adicionou-se 1,9 mL de clorofórmio: metanol (2:1, v/v) em 0,1 g de fígado fresco, misturou-se e submeteu-se à trituração. Assim, uma alíquota de 0,4 mL de metanol PA foi adicionada e depois centrifugada a 3500 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi recolhido, adicionado 0,8 mL de clorofórmio, 0,64 mL de solução de NaCl a 0,73 % e em seguida foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e na fase inferior foi realizada a adição de 1 mL de solução

de Folch (clorofórmio:metanol:água:NaCl 0,2 % - 3:48:47:2, v/v/v/v), sendo lavada por três vezes e adicionado 5 mL de clorofórmio:metanol (2:1, v/v), e o conteúdo foi seco em estufa à 37 °C por 8 hs. O teor de lipídeos totais da amostra foi determinado. O conteúdo seco foi ressuspensão em 1 mL de isopropanol para as análises de colesterol total e triglicérides.

2.11.5.2 Análise do colesterol total e triglicérides

Os níveis hepáticos de colesterol total e triglicérides foram determinados utilizando kits de ensaio enzimático, de acordo com as instruções do fabricante para os respectivos kits (Colestat enzimático AA e TG color GPO/PAP AA, Wiener laboratories, Rosario, Argentina). Para tanto, foi utilizado o material seco resultante do processamento do fígado, procedimento descrito na sessão anterior (2.11.5.1), ressuspensão em 1 mL de isopropanol.

2.12 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão, avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação de médias pelo teste de Tukey. Valores de p menores do que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os cálculos foram realizados utilizando o *Software* estatístico *GraphPad Prism* versão 5.0, (San Diego, Califórnia, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Dietas experimentais

A semente de chia e a farinha fibrosa exibem conteúdo de fenólicos totais e perfil dos compostos fenólicos similares, sendo os ácidos fenólicos a classe de compostos majoritários, e os principais compostos identificados são o ácido caféico, danshensu, ácido rosmarínico e ácido ferúlico, os quais apresentam atividade eletroquímica (Oliveira-Alves *et al.*, 2017). Os ácidos fenólicos e seus derivados têm demonstrado atividade inibitória no crescimento de células tumorais afetando a carcinogênese (Weng & Yen, 2012).

A **Tabela 1** apresenta a composição química e os teores de ácidos graxos e compostos fenólicos das dietas experimentais. As dietas experimentais elaboradas são isocalóricas, apresentando em média $4080,27 \pm 13,19$ kcal/kg, com 18 % de proteínas e 7 % de lipídeos totais.

Tabela 1. Ingredientes e composição das dietas experimentais (g/kg).

	AIN-93M	DS10	DS15	DS20	DF10	DF15	DF20
<i>Ingredientes (g/kg dieta)</i>							
Caseína ¹	200	180	170	160	170	155	140
Maltodextrina	155	155	155	155	155	155	155
Amido de milho	375,692	325,692	300,692	275,692	315,692	285,692	255,692
Sacarose	100	100	100	100	100	100	100
Óleo de soja	70	40	25	10	60	55	50
Semente de chia	0	100	150	200	0	0	0
Farinha fibrosa de chia	0	0	0	0	100	150	200
Celulose	50	50	50	50	50	50	50
Mineral mix (AIN-93M-MX)	35	35	35	35	35	35	35
Vitamina mix (AIN-93-VX)	10	10	10	10	10	10	10
L-Cistina	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>tert</i> -Butil hidroquinona	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
<i>Composição (g/kg dieta)</i>							
Proteínas totais	183,70 ± 0,37	184,2 ± 0,24	182,5 ± 0,32	185,80 ± 0,18	183,9 ± 0,22	182,7 ± 0,25	186,20 ± 0,29
Lipídeos totais	71,42 ± 0,07	71,90 ± 0,05	71,51 ± 0,07	75,55 ± 0,03	71,8 ± 0,05	72,4 ± 0,07	75,50 ± 0,03
Carboidratos totais	675,20 ± 0,14	677,90 ± 0,11	679,7 ± 0,11	667,40 ± 0,08	672,4 ± 0,12	670,3 ± 0,09	661,20 ± 0,10
Energia (kcal/kg dieta)	4078,20 ± 0,49	4096,00 ± 0,35	4092,20 ± 0,42	4092,30 ± 0,37	4072,50 ± 0,42	4065,20 ± 0,38	4065,50 ± 0,44

	AIN-93M	DS10	DS15	DS20	DF10	DF15	DF20
<i>Chia</i>							
Fibra alimentar total*	0	35,50 ± 0,59	53,30 ± 0,59	71,00 ± 0,60	40,90 ± 0,90	61,35 ± 0,92	81,80 ± 0,90
Fibra alimentar insolúvel*	0	31,90 ± 0,50	47,90 ± 0,51	63,80 ± 0,49	36,40 ± 0,79	54,60 ± 0,84	72,80 ± 0,88
Fibra alimentar solúvel *	0	3,60 ± 0,15	5,40 ± 0,11	7,20 ± 0,09	4,50 ± 0,12	6,80 ± 0,06	9,01 ± 0,01
Fenólicos totais chia (mg GAE/kg dieta)*	0	144,00 ± 0,08	216,00 ± 0,08	288,00 ± 0,08	149,00 ± 0,07	223,50 ± 0,07	298,00 ± 0,07
<i>Ácidos graxos (g/kg dieta)</i>							
Palmítico (C16:0)	2,03 ± 0,12	10,53 ± 0,13	9,97 ± 0,10	9,16 ± 0,17	15,55 ± 0,11	11,53 ± 0,07	11,35 ± 0,09
Esteárico (C18:0)	4,05 ± 0,06	4,04 ± 0,03	3,93 ± 0,04	3,97 ± 0,04	5,60 ± 0,05	4,36 ± 0,05	3,93 ± 0,12
Oléico (C18:1 ω -9)	25,69 ± 0,09	18,89 ± 0,06	15,26 ± 0,12	11,15 ± 0,02	26,88 ± 0,03	23,48 ± 0,07	22,40 ± 0,05
Linoléico (C18:2 ω -6)	50,18 ± 0,30	36,24 ± 0,04	30,19 ± 0,05	24,43 ± 0,08	35,99 ± 0,03	43,77 ± 0,21	41,49 ± 0,12
α -Linolênico (C18:3 ω -3)	5,49 ± 0,04	28,34 ± 0,24	38,79 ± 0,12	49,94 ± 0,02	9,40 ± 0,01	14,68 ± 0,24	18,78 ± 0,39
SFA total	18,15 ± 0,23	16,03 ± 0,11	15,30 ± 0,11	14,06 ± 0,03	26,04 ± 0,04	17,50 ± 0,02	17,37 ± 0,13
MUFA total	26,18 ± 0,10	19,39 ± 0,14	15,72 ± 0,06	11,57 ± 0,03	28,57 ± 0,02	24,06 ± 0,02	22,91 ± 0,05
PUFA total	55,67 ± 0,34	64,58 ± 0,25	68,98 ± 0,17	74,37 ± 0,06	45,39 ± 0,07	58,45 ± 0,04	60,27 ± 0,06
(ω -6/ ω -3)-PUFA razão	9,14 ± 0,01	1,28 ± 0,01	0,78 ± 0,01	0,49 ± 0,01	3,83 ± 0,01	2,98 ± 0,04	2,21 ± 0,01

Grupo DC: AIN-93M dieta controle; Grupo DS10: 10 % (m/m) de semente de chia na dieta; Grupo DS15: 15 % (m/m) de semente de chia na dieta; DS20: 20 % (m/m) de semente chia na dieta;

Grupo DF10: 10% (m/m) de farinha de chia na dieta; Grupo DS15: 15 % (m/m) de farinha de chia na dieta; DS20: 20 % (m/m) de farinha de chia na dieta.

SFA: ácidos graxos saturados; MUFA: ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: ácidos graxos poli-insaturados.

¹ Cálculo baseado no conteúdo de proteínas igual a 86 % para fornecer 18 g de proteínas/100g de dieta.

* Cálculo baseado nos resultados obtidos a partir das análises da semente, farinha fibrosa e óleo de chia.

O conteúdo de compostos fenólicos totais (TPC) foi determinado na semente e farinha de chia e não apresentaram diferença estatística. Os valores obtidos de TPC semente e farinha de chia foram $1,44 \pm 0,01$ mg GAE/g e $1,49 \pm 0,01$ mg GAE/g, respectivamente. Os grupos DS20 (288,0 mg GAE/g) e DF20 (298,0 mg GAE/g) possuem maior conteúdo de compostos fenólicos totais em relação aos demais grupos experimentais, entretanto a dieta DS20 apresenta maior conteúdo de ácido graxo α -linolênico e menor razão (ω -6/ ω -3)-PUFA (**Tabela 1**).

As dietas com semente de chia (DS10, DS15 e DS20) apresentam elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados e baixa proporção (ω -6/ ω -3)-PUFA em comparação com as dietas contendo farinha fibrosa (DF10, DF15 e DF20) e dieta controle (DC), de acordo com o objetivo deste estudo.

3.2 Ensaio antitumoral

3.2.1 Massa corporal e parâmetros de consumo

A **Figura 2** apresenta as médias da variação da massa corporal no decorrer dos 56 dias de experimento.

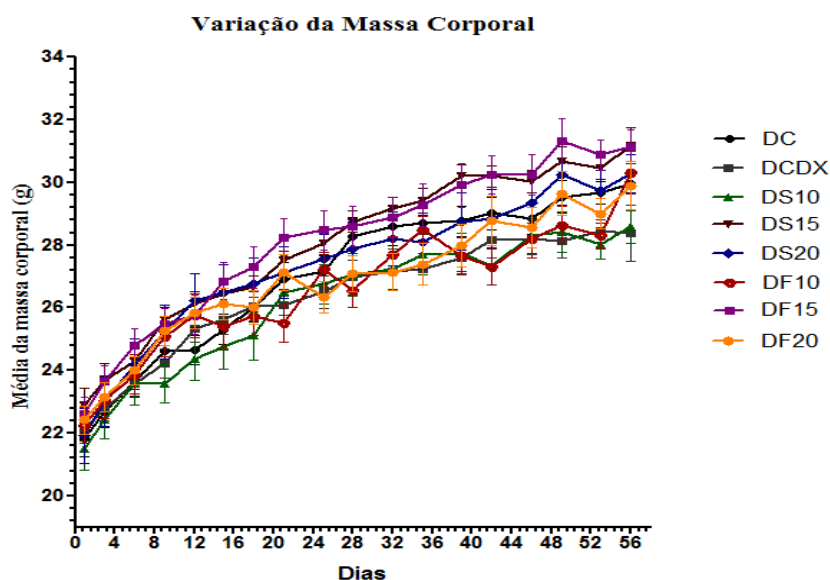


Figura 2. Variação da massa corporal nos grupos experimentais ao longo de 56 dias de experimento. O inóculo do tumor sólido de Ehrlich foi realizado no 36º dia. Os resultados são expressos como média da massa corporal (g) $\pm$ desvio padrão dos grupos. DC: controle; DCDX: Doxo (3mg/k, i.p.); DS10, DS15 e DS20: dieta contendo 10 %, 15 % e 20 % de semente de chia; DF10, DF15 e DF20: dieta contendo 10 %, 15 % e 20 % de farinha fibrosa de chia. One way ANOVA, seguido de teste de Tukey para comparação dos diferentes grupos ($p < 0,05$).

A variação da massa corporal dos animais no modelo experimental (**Figura 2**) apresentou, no período de pré-tratamento (1º ao 35º dia) com as dietas, o comportamento crescente de ganho de massa em todos os grupos experimentais, portanto as dietas experimentais não apresentaram diferença significativa quanto ao ganho de massa corporal. As células tumorais (modelo tumoral sólido de Ehrlich) foram inoculadas no tecido subcutâneo do flanco dos animais no 36º dia e o desenvolvimento tumoral foi acompanhado do 36º dia ao 56º dia, bem como os sinais clínicos dos animais.

A massa corporal inicial foi semelhante entre os animais dos diferentes grupos experimentais (22,21g em média), não havendo diferença significativa. O mesmo pode ser observado para os parâmetros de consumo diário em gramas, indicando que as dietas são isocalóricas e bem aceitas pelos diferentes grupos (**Tabela 2**).

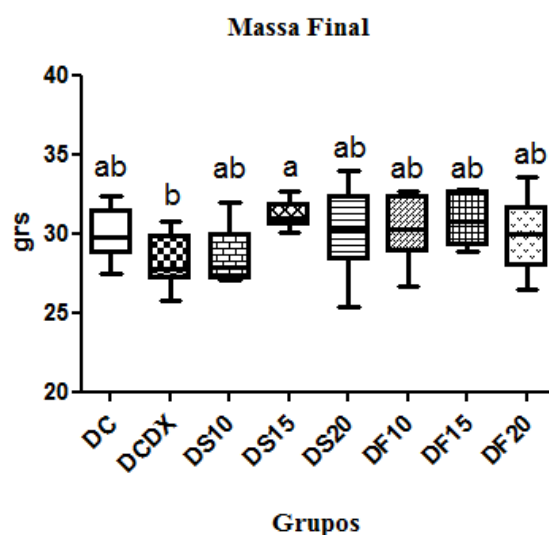


Figura 3. Massa corporal final (g), após 56 dias de experimento, para os diferentes grupos. Os resultados são expressos como média da massa corporal (g) $\pm$ desvio padrão para os diferentes grupos. DC: controle; DCDX: Doxo (3mg/k, i.p.); DS10, DS15 e DS20: dieta contendo 10 %, 15 % e 20 % de semente de chia; DF10, DF15 e DF20: dieta contendo 10 %, 15 % e 20 % de farinha fibrosa de chia. One way ANOVA, seguido de teste de Tukey para comparação dos diferentes grupos ($p < 0,05$).

A massa corporal final, no 56º dia, exibiu diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos, pois o grupo DCDX apresentou significativamente menor massa corporal e o grupo DS15 maior massa corporal (**Figura 3**). Os grupos DS10, DS20, DF10, DF15, DF20 e DC não demonstraram diferença significativa quanto a massa corporal final.

Tabela 2. Crescimento e parâmetros do consumo alimentar dos animais.

Parâmetros	DC	DCDX	DS10	DS15	DS20	DF10	DF15	DF20
Massa corporal inicial (g)	21,81 ± 1,67 ^a	22,31 ± 1,14 ^a	21,48 ± 1,96 ^a	22,90 ± 1,55 ^a	21,91 ± 2,57 ^a	22,26 ± 1,71 ^a	22,61 ± 1,58 ^a	22,42 ± 1,34 ^a
Massa corporal final (g)	29,95 ± 1,57 ^{ab}	28,20 ± 1,68 ^b	28,58 ± 1,82 ^{ab}	31,17 ± 0,84 ^a	30,28 ± 2,71 ^{ab}	30,31 ± 2,02 ^{ab}	30,92 ± 1,62 ^{ab}	29,90 ± 2,29 ^{ab}
Ganho massa corporal (g/dia)	0,15 ± 0,01 ^a	0,11 ± 0,02 ^a	0,13 ± 0,02 ^a	0,15 ± 0,02 ^a	0,15 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,02 ^a	0,15 ± 0,01 ^a	0,13 ± 0,02 ^a
Consumo da dieta (g/dia)	3,87 ± 0,51 ^a	3,73 ± 0,42 ^a	3,67 ± 0,65 ^a	4,13 ± 0,57 ^a	3,94 ± 0,43 ^a	3,81 ± 0,77 ^a	4,01 ± 0,52 ^a	3,72 ± 0,46 ^a
Consumo da dieta (Kcal/dia)	15,78 ± 1,21 ^a	15,22 ± 1,19 ^a	15,03 ± 0,87 ^a	16,89 ± 0,94 ^a	16,12 ± 0,92 ^a	15,51 ± 0,81 ^a	16,30 ± 0,95 ^a	15,14 ± 1,02 ^a
Índice de eficiência alimentar*	0,04 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,01 ^a

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão.

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa (p<0,05) pelo teste de Tukey.

* Índice de eficiência alimentar = (ganho massa corporal dia/consumo dia).

O grupo DCDX apresentou redução significativa da massa corporal final devido à administração intraperitoneal de 3 mg/kg da doxorubicina (DOX), que é um antibiótico do grupo das antraciclinas com elevado efeito antineoplásico, sendo utilizado principalmente em tratamentos de tumores sólidos e doenças hematológicas, porém sua aplicação é limitada devidos aos efeitos colaterais, que incluem cardiotoxicidade aguda, desordens gastrointestinais, injúria hepática, alopecia e nefropatia (Tacar *et al.*, 2013).

Porém, o grupo DCDX não apresentou diferença significativa quanto ao ganho de massa corporal ($0,11 \pm 0,02$ g/dia) comparado com demais grupos experimentais no decorrer do ensaio (**Tabela 2**). Não houve diferença significativa para os grupos experimentais quanto ao consumo diário das dietas.

3.2.2 Atividade antitumoral

A fim de avaliar os efeitos *in vivo* do consumo da semente e farinha fibrosa de chia em um modelo tumoral, utilizou-se o modelo de tumor sólido de Ehrlich, inoculado no tecido subcutâneo do flanco dos animais. Este tumor é de crescimento rápido e agressivo, e por ser inoculado no flanco dos animais permite analisar o efeito sistêmico do pré-tratamento de 35 dias e ao longo de 21 dias do desenvolvimento tumoral.

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia maligna indiferenciada derivada de carcinoma da mama em camundongos, com alta capacidade transplantável e taxa proliferativa rápida, sendo que o mesmo apresenta muitas semelhanças com tumores humanos e sensíveis à quimioterapia (Ehrlich, 1906; Gherman *et al.*, 2012; Bahr *et al.*, 2015).

Estudos têm demonstrado o uso benéfico do carcinoma ascítico de Ehrlich e dos modelos de tumores sólidos como uma ferramenta valiosa na exploração de atividades biológicas no câncer, e principalmente na avaliação dos efeitos potenciais de medicamentos, extratos de plantas, óleos vegetais e compostos fenólicos extraídos de alimentos (Espada, *et al.*, 2007; Vendramini-Costa *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Kabel *et al.*, 2013; Miranda-Vilela *et al.*, 2014; Iwamoto *et al.*, 2015; Bahr *et al.*, 2015; Roleira *et al.*, 2015). Entretanto, poucas investigações têm sido realizadas com dietas alimentares contendo sementes oleaginosas.

A **Figura 4** apresenta a massa relativa tumoral (%), massa do tumor, área de necrose e área tumoral dos grupos experimentais. Nesse modelo experimental, os

grupos que consumiram dieta com semente de chia; DS10 ($0,44 \pm 0,15$ %), DS15 ($0,45 \pm 0,12$ %) e DS20 ($0,42 \pm 0,05$ %); reduziram o crescimento da massa tumoral (**Figura 4-A**), assim como o grupo tratado com o quimioterápico DCDX ($0,26 \pm 0,10$), porém, os grupos DS10, DS15 e DS20 não exibiram diferença significativa em comparação com o grupo controle (DC). Em relação ao grupo DC ($0,57 \pm 0,19$ %), a porcentagem de redução da massa relativa tumoral nos grupos foram de 54,39 %, 22,81 %, 21,05 % e 26,32 % para DCDX, DS10, DS15 e DS20, respectivamente.

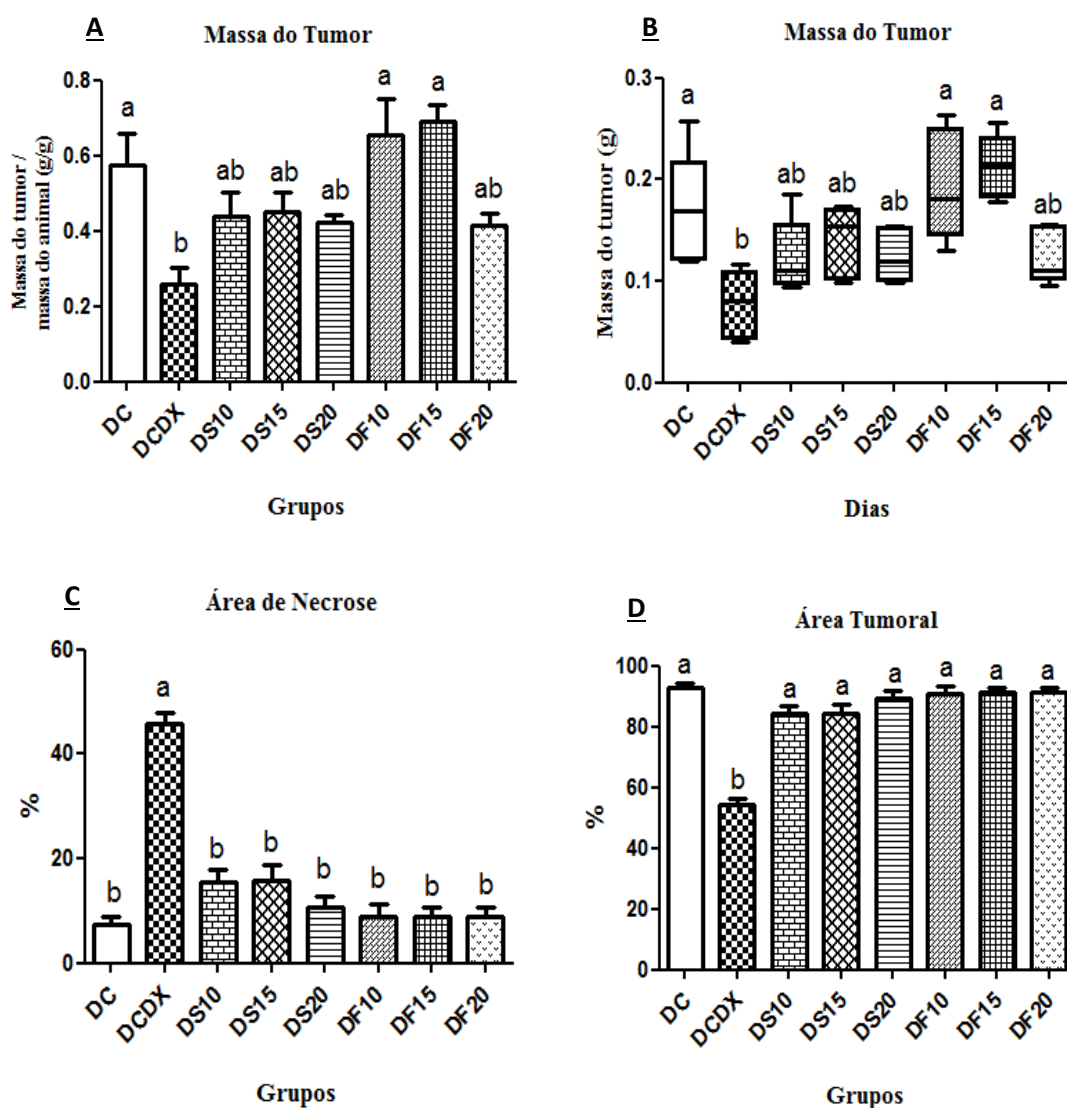


Figura 4. Atividade antitumoral dos diferentes grupos em modelo de tumor sólido de Ehrlich. DC: controle; DCDX: Doxo (3mg/k, i.p.); DS10, DS15 e DS20: dieta contendo 10 %, 15 % e 20 % de semente de chia; DF10, DF15 e DF20: dieta contendo 10 %, 15 % e 20 % de farinha fibrosa de chia. Tumor: (A) Massa relativa tumoral; (B) Massa tumoral (g); (C) Área de necrose (%) e (D) Área tumoral (%). Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. One way ANOVA, seguido de teste de Tukey para comparação dos diferentes grupos ($p < 0,05$).

O grupo DCDX apresentou redução significativa do tumor em comparação com DC devido a ação antiproliferativa conhecida da DOX. A DOX atua sobre os ácidos nucleicos das células em divisão por dois mecanismos: a intercalação entre os pares de bases das cadeias de DNA, inibindo assim a síntese de DNA e RNA em células de crescimento rápido, bloqueando a replicação e transcrição dos processos; e na geração de radicais livres mediados pelo ferro, causando danos oxidativos as membranas celulares, proteínas e DNA (Thorn *et al.*, 2011; Cagel *et al.*, 2017).

Entretanto, os grupos que consumiram dieta com farinha fibrosa de chia, DF10 ($0,66 \pm 0,21$ %) e DF15 ($0,69 \pm 0,10$ %), não exibiram redução da massa tumoral, com exceção do grupo DF20 ($0,42 \pm 0,07$ %). O grupo DF20 exibiu redução similar aos grupos que receberam dieta contendo semente de chia, apresentando 26,32 % de redução da massa relativa tumoral.

De acordo com os resultados obtidos, os grupos alimentados com dieta contendo chia não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo DC, entretanto os grupos DS10, DS15, DS20 e DF20 apresentaram redução da massa do tumoral, indicando que o consumo regular de semente de chia pode prevenir o crescimento de tumores (**Figura 4-B**). Portanto, nesse modelo experimental de tumor sólido de Ehrlich, o consumo de dietas com semente e farinha de chia com baixa proporção de (ω -6/ ω -3)-PUFA, entre 2,21 a 0,49 (**Tabela 1**), promoveram redução na massa tumoral. Portanto sugere-se que a redução ocorreu devido ao maior consumo de ω 3-PUFA por esses grupos. Entretanto os grupos DF10 e DF15 que consumiram uma dieta com maior teor de compostos fenólicos, não exibiram redução na massa tumoral.

Estudos têm relatado que o consumo elevado de ω 3-PUFA tem reduzido o crescimento tumoral e os processos inflamatórios (Wang *et al.*, 2014; Tokudome *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2017). A sinalização lipídica é desregulada nos tecidos tumorais, levando ao aumento da produção de eicosanóides pró-inflamatórios e pró-tumorigênicos a partir do ácido araquidônico (ARA) no microambiente tumoral (Wang *et al.*, 2014). O ARA (20:4 ω -6) é um ω 6-PUFA metabolicamente derivado do ácido graxo linoléico (LA), sendo substrato para duas classes de enzimas; as prostaglandinas sintases (PG), que produzem os prostanóides, prostaciclina e tromboxanos, pela ação primária da enzima ciclooxigenase (COX); e as lipoxigenases (LOX), que catalisam a biossíntese dos ácidos hidroxi-eicosatetraenóicos (HETE) e leucotrienos (Rose & Connolly, 1999).

A via COX-2 desempenha um papel crítico na angiogênese, inflamação e câncer, pois é um dos metabólitos da COX-2 e o aumento da expressão de COX-2 tem sido observado em muitos tecidos tumorais (Wang & Dubois, 2010; Wang *et al.*, 2014). A COX ocorre de duas formas: a isoforma COX-1, constitutiva em muitos tecidos, a qual desempenha um papel na agregação plaquetária e na citoproteção gástrica, sendo considerada como geradora de PG para a função fisiológica normal; e a isoforma COX-2, induzida principalmente durante a inflamação, cicatrização e neoplasia (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012).

Estudos relatam que os ω 3-PUFA podem diminuir o risco de câncer através do seu efeito supressor sobre a biossíntese de eicosanóides derivados do ARA, e as altas ingestões de ω 3-PUFA resultam na sua incorporação como fosfolipídios nas membranas celulares, onde substituem parcialmente ARA (Crawford *et al.*, 2000; Larsson, *et al.*, 2004). Pesquisadores enfatizam a importância do consumo de baixa proporção de (ω 6/ ω 3)-PUFA nas refeições diárias, em vez dos níveis absolutos das duas classes, isso porque os ω 3-PUFA competem com os ω 6-PUFA por dessaturases e elongases (Larsson, *et al.*, 2004; Colussi *et al.*, 2017). Os ω 3-PUFA possuem maior afinidade com essas enzimas do que os ω 6-PUFA, portanto uma maior ingestão de ω 3-PUFA reduz a dessaturação e alongamento de LA para ARA, e conseqüentemente, reduz a produção dos derivados de ARA-eicosanóides (Rose & Connolly, 1999; Colussi *et al.*, 2017).

O ácido graxo α -linolênico (18:3- ω 3) é um ω 3-PUFA que fornece substrato para a conversão enzimática para eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), pois em comparação com ARA, o EPA é o substrato preferencial para a lipoxigenase; portanto, um maior consumo de ω 3-PUFA leva à uma formação mais elevada dos produtos das enzimas lipoxigenases (Grimm *et al.*, 2002; Larsson, *et al.*, 2004). Assim, quando as fontes de ácidos graxos são ω 3-PUFA, a via COX produz lipoxinas, protectinas e resolvinas, as quais estão diretamente envolvidas na resolução dos processos inflamatórios. Portanto o elevado consumo de ω 3-PUFA pode contribuir para redução dos processos inflamatórios crônicos envolvidos no desenvolvimento de muitos tumores (Greene *et al.*, 2011; Vendramini-Costa & Carvalho, 2012).

A resistência à processos de morte celular é uma característica das células tumorais e está diretamente relacionada à tumorigênese (Hanahan e Weinberg, 2011). Desta forma, tratamentos que sejam capazes de conter a progressão tumoral, seja inibindo a multiplicação de células tumorais ou causando morte celular são consideradas efetivas no tratamento e contenção do tumor. Neste estudo avaliou-se

áreas de necrose no tecido tumoral através de análise histológica, uma indicação do efeito antitumoral dos tratamentos.

A **Figura 4-C** e **Figura 4-D** apresentam a quantificação das áreas de necrose e áreas tumorais dos cortes transversais do tumor sólido de Ehrlich dos grupos experimentais e as imagens histopatológicas dos tumores são demonstradas na **Figura 5**. No aspecto histológico, a implantação subcutânea do tumor sólido de Ehrlich resultou em uma massa tumoral envolvida por uma pseudocápsula, constituída por células pleomórficas com citoplasma abundante e células gigantes multinucleadas, com pequenas áreas de necrose rodeada por células tumorais viáveis.

O grupo DCDX apresentou extensa região de necrose, ocorrendo maior área de necrose na região central, porém o grupo DC apresentou pequenas áreas de necrose, não sendo observado área necrose central, conforme demonstrado na **Figura 5**. Histologicamente, os tumores dos grupos DS10, DS15, DS20, DF10, DF15 e DF20 foram semelhantes, não havendo diferença significativa quanto a área de necrose e massa relativa tumoral (**Figura 4-C** e **Figura 4-A**).

De acordo com **Figura 4-C**, a área de necrose do grupo DCDX ($45,86 \pm 4,37$ %) foi significativamente maior em relação ao grupo DC ($7,26 \pm 3,39$ %) e aos grupos tratados com semente e farinha de chia. A redução da área tumoral do grupo DCDX ocorreu devido ao tratamento com quimioterápico DOX. Os grupos tratados com a dieta contendo diferentes proporções de chia, DS10 ($15,55 \pm 5,55$ %), DS15 ($15,75 \pm 6,56$ %), DS20 ($10,56 \pm 5,05$ %), DF10 ($8,97 \pm 5,18$ %), DF15 ($8,88 \pm 4,33$ %) e DF20 ($8,91 \pm 3,80$ %) foram significativamente diferente do grupo DCDX, não apresentando extensas áreas de necrose. A DOX é um agente de intercalação de DNA que causa danos ao DNA nuclear e mitocondrial resultando na morte celular, portanto sendo um anticancerígeno potente (Minotti *et al.*, 2004; Tacar *et al.*, 2013). Estudos sugerem que a DOX resulta na autofagia, devido à sua ação citoprotetora em resposta aos danos no DNA (Tacar *et al.*, 2013).

De acordo com os resultados obtidos, o consumo das dietas contendo semente e farinha de chia não reduziu significativamente a área tumoral, como ocorreu com o grupo tratado com DOX (DCDX), que apresentou redução média de 54,38 %. Entretanto, os grupos pré-tratados com 10 %, 15 %, 20 % de semente de chia e 20 % farinha de chia apresentaram redução média de 24,12 % na massa tumoral, indicando que o consumo regular da semente pode prevenir o crescimento tumoral.

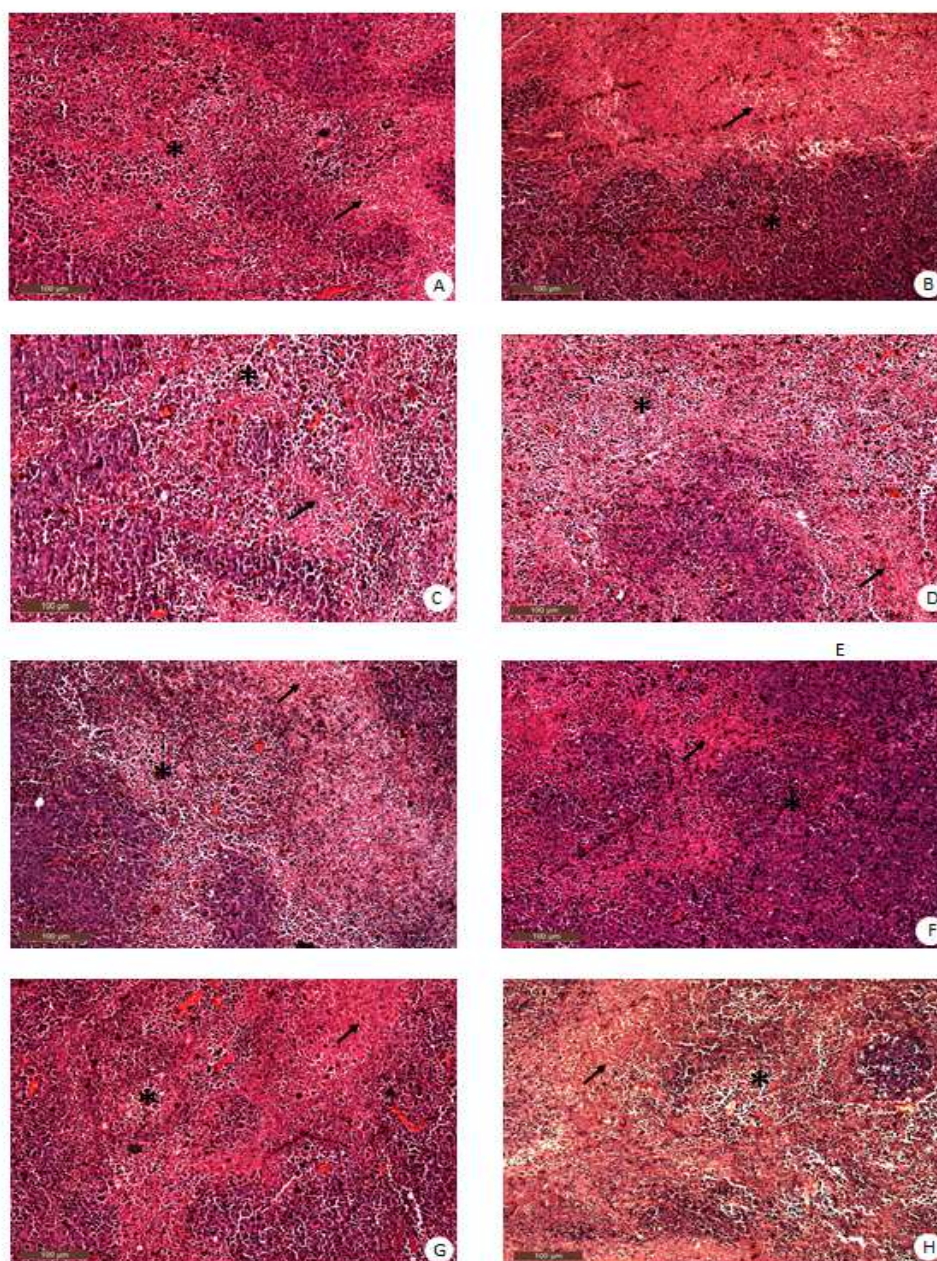


Figura 5. Análise histopatológica do tumor solido de Ehrlich experimental. **(A)** nota-se a presença de áreas de necrose (seta) e área tumoral (asterisco) do grupo controle (HE 100x). **(B)** nota-se o aumento das áreas necrosadas (seta) em relação à área tumoral (asterisco) no grupo tratado com doxorubicina (HE, 100x). **(C)** nota-se pequena áreas necrosadas (seta) e maior área tumoral (asterisco) no grupo tratado com semente de chia 10 % (HE, 100x). **(D)** nota-se pequena áreas necrosadas (seta) e maior área tumoral (asterisco) no grupo tratado com semente de chia 15 % (HE, 100x). **(E)** nota-se pequena áreas necrosadas (seta) e maior área tumoral (asterisco) no grupo tratado com semente de chia 20 % (HE, 100x). **(F)** nota-se pequenas áreas necrosadas (seta) e maior área tumoral (asterisco) no grupo tratado com farinha de chia 10 % (HE, 100x). **(G)** nota-se pequena áreas necrosadas (seta) e maior área tumoral (asterisco) no grupo tratado com farinha de chia 15 % (HE, 100x). **(H)** nota-se pequena áreas necrosadas (seta) e maior área tumoral (asterisco) no grupo tratado com farinha de chia 20 % (HE, 100x). Nota-se um aumento das áreas necrosadas (setas) e redução da área tumoral (asterisco) no grupo tratado com doxorubicina, quando comparado ao grupo controle (HE, 100x). Não foram observados diferenças significativas na % da área de necrose entre os grupos tratados com semente e farinha de chia quando comparado ao grupo controle (HE, 100x).

3.2.3 Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Os parâmetros hematológicos fornecem o perfil dos elementos celulares do sangue, demonstrando os valores quantitativos dos leucócitos totais (WBC), eritrócitos (RBC) e plaquetas (PLT), bem como a concentração de hemoglobina (HGB) e a porcentagem de hematócritos (% hemácias no sangue). A **Tabela 3** apresenta os parâmetros hematológicos dos grupos experimentais no final do experimento. Para fins de referência, os parâmetros hematológicos dos camundongos Balb/C sadios (sem tumores), da mesma idade e recebendo a dieta controle (DC), foram inseridos na **Tabela 3**.

Observar-se que houve aumento da quantidade de leucócitos totais (leucocitose) no grupo controle com tumor (DC), em relação aos animais sadios (DC sadio), o que pode ser indício de recrutamento de células do sistema imune, principalmente células mielóides, para tecidos periféricos, processo comum ao desenvolvimento tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011; Deronic *et al.*, 2016). Tumores experimentais, como o tumor sólido de Ehrlich, produzem mudanças severas no sistema hematopoético do hospedeiro, sendo frequentemente associadas com imunodepressão e leucocitose granulócito-dependente (Bincoletto *et al.*, 2005).

Como esperado, o tratamento com doxorrubicina limita a expansão de leucócitos, diminuição de 56,23 % em comparação ao grupo DC, acompanhada de redução da porcentagem de hematócritos e quantidade de eritrócitos (RBC) no sangue (**Tabela 3**). A diminuição dos parâmetros hematológicos no grupo DCDX ocorreu devido ao efeito antitumoral da doxorrubicina, limitando assim o recrutamento de células provenientes da medula óssea, e aos seus efeitos hematotóxicos, sendo a hipoplasia sanguínea um dos seus principais efeitos colaterais (Richardson & Johnson, 1997). Os estudos com modelo experimentais de câncer de mama e pulmão em camundongos têm relatado redução significativa de leucócitos totais (37,61 %) em consequência do tratamento com doxorrubicina (Cabeza *et al.*, 2017).

Não houve diferença significativa quanto a concentração de leucócitos totais entre os grupos DC sadio e os grupos experimentais DCDX, DS10, DS15, DS20, DF10, DF15 e DF20. Entretanto o grupo DC ($6,58 \pm 2,59 \times 10^3/\mu\text{L}$) apresentou maior quantidade de leucócitos totais em comparação com DC sadio devido às mudanças severas no sistema hematopoético dos animais.

Tabela 3. Parâmetros hematológicos dos grupos experimentais.

Parâmetros Hematológicos	DC sadio	DC	DCDX	DS10	DS15	DS20	DF10	DF15	DF20
Leucócitos totais ($10^3/\mu\text{L}$)	$3,45 \pm 1,11^b$	$6,58 \pm 2,59^a$	$2,88 \pm 1,97^b$	$2,68 \pm 1,17^b$	$3,68 \pm 0,83^b$	$3,78 \pm 0,68^b$	$5,38 \pm 2,10^{ab}$	$4,52 \pm 1,55^{ab}$	$2,52 \pm 0,45^b$
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	$10,13 \pm 0,71^b$	$11,35 \pm 0,34^a$	$9,95 \pm 1,13^b$	$11,08 \pm 0,91^{ab}$	$11,34 \pm 0,53^a$	$11,00 \pm 0,42^{ab}$	$10,90 \pm 0,48^{ab}$	$11,48 \pm 0,42^a$	$10,76 \pm 0,57^{ab}$
Hemoglobina (g/dL)	$14,10 \pm 0,89^a$	$15,57 \pm 0,29^a$	$13,78 \pm 1,53^a$	$14,93 \pm 1,08^a$	$15,02 \pm 0,61^a$	$14,88 \pm 0,48^a$	$14,73 \pm 0,68^a$	$15,43 \pm 0,54^a$	$14,43 \pm 0,83^a$
Hematócritos (%)	$48,82 \pm 3,18^b$	$54,55 \pm 1,09^a$	$48,72 \pm 5,51^b$	$52,80 \pm 3,76^{ab}$	$54,23 \pm 2,29^{ab}$	$53,70 \pm 1,99^{ab}$	$52,85 \pm 2,54^{ab}$	$55,90 \pm 2,34^a$	$52,02 \pm 2,64^{ab}$
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	$1386 \pm 76,63^c$	$1752 \pm 167,6^{ab}$	$1782 \pm 181,4^{ab}$	$1513 \pm 214,1^{bc}$	$2026 \pm 249,1^a$	$1473 \pm 88,78^{bc}$	$1566 \pm 116,7^{bc}$	$1876 \pm 232,9^b$	$1543 \pm 224,9^{bc}$

Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos dos grupos experimentais.

Parâmetros Bioquímicos	DC sadio	DC	DCDX	DS10	DS15	DS20	DF10	DF15	DF20
TGP (U/L)	$54,90 \pm 15,46^a$	$54,75 \pm 19,76^a$	$96,20 \pm 91,27^a$	$98,90 \pm 37,09^a$	$71,22 \pm 18,45^a$	$83,07 \pm 25,61^a$	$79,40 \pm 51,97^a$	$67,37 \pm 28,79^a$	$40,38 \pm 9,45^a$
TGO (U/L)	$375,80 \pm 42,17^a$	$392,70 \pm 129,30^a$	$482,00 \pm 153,00^a$	$458,70 \pm 118,40^a$	$397,30 \pm 47,48^a$	$427,70 \pm 76,49^a$	$366,70 \pm 62,37^a$	$499,50 \pm 55,50^a$	$416,20 \pm 55,16^a$
ALP (U/L)	$72,80 \pm 16,48^c$	$96,50 \pm 11,95^{bc}$	$75,18 \pm 8,25^{bc}$	$112,40 \pm 15,11^{ab}$	$110,10 \pm 22,19^{ab}$	$130,00 \pm 20,89^a$	$117,20 \pm 21,29^{ab}$	$102,80 \pm 12,01^{ab}$	$88,70 \pm 15,92^{abc}$
GGT (U/L)	$<5,0 \pm 0,0^a$	$<5,0 \pm 0,0^a$	$<5,0 \pm 0,0^a$	$<5,0 \pm 0,0^a$	$<5,0 \pm 0,0^a$	$<5,0 \pm 0,0^a$	$<5,0 \pm 0,0^a$	$<5,0 \pm 0,0^a$	$<5,0 \pm 0,0^a$

Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Não houve diferença significativa na concentração de eritrócitos nos grupos DCDX , DS10, DS20 , DF10 e DF20 em comparação com o grupo sadio ($10,13 \pm 0,71 \times 10^6/\mu\text{L}$). Entretanto, os grupos DS15 ($11,34 \pm 0,53 \times 10^6/\mu\text{L}$) e DF15 ($11,48 \pm 0,42 \times 10^6/\mu\text{L}$) apresentaram significativamente maior teor de eritrócitos do que o grupo DC sadio, mas não foram estatisticamente diferente do grupo DC ($11,35 \pm 0,34 \times 10^6/\mu\text{L}$).

Os grupos experimentais não exibiram diferença significativa quanto à concentração de HGB em comparação com o grupo DC sadio, portanto o crescimento tumoral não alterou a concentração de HGB no sangue dos animais (**Tabela 3**).

Houve diferença significativa na porcentagem de hematócritos entre o grupo DC sadio ($48,82 \pm 3,18 \%$) e o grupo DC ($54,55 \pm 1,09 \%$), demonstrando que o tumor inoculado promoveu alterações no sistema hematopoético dos animais. Os grupos DS10, DS15, DS20, DF10 e DF20 não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo DC sadio e DC quanto a concentração de hematócritos.

O grupo DC sadio ($1386 \pm 76,63 \times 10^3/\mu\text{L}$) apresentou diferença significativa para valores quantitativos de plaquetas em comparação com os grupos DC, DCDX, DS15 e DF15. Entretanto o grupo DS15 ($2026 \pm 249,1$) e DF15 ($1876 \pm 232,9$) foram estatisticamente diferente do grupo DC sadio, porém não apresentaram diferença estatística com o grupo DC.

As análises bioquímicas são parâmetros de importante avaliação para determinação dos possíveis efeitos adversos nos tecidos vitais dos animais, efeitos estes resultantes do desenvolvimento da doença ou efeitos colaterais do tratamento. TGO, TGP e ALP são enzimas biomarcadoras de lesões hepáticas, portanto elevados índices dessas enzimas indicam danos no fígado (Subramani *et al.*, 2014). A atividade enzimática TGP no soro sanguíneo é utilizada especificamente para avaliar necrose hepática e doenças hepatocelulares nos animais, enquanto a atividade enzimática TGO é específica para avaliar infarto do miocárdio e doenças hepáticas (Loeb & Quimby, 1999).

Os valores de TGP, TGO e GGT não diferiram significativamente entre os grupos experimentais em comparação com o grupo DC sadio, demonstrando que o tumor sólido de Ehrlich não causou alterações nas funções hepáticas dos animais (**Tabela 4**). Do mesmo modo, o grupo tratado com o quimioterápico doxorrubicina não exibiu diferença significativa em relação ao grupo controle e os grupos experimentais com dieta de chia.

Não houve diferença significativa nos valores quantitativos de ALP entre os grupos experimentais DC sadio, DC, DCDX e DF20, porém foram estatisticamente diferentes de DS10, DS15, DS20, DF10 e DF15. Embora os grupos experimentais do ensaio tumoral não tenham apresentado diferença estatística com relação ao grupo DC, o grupo DS20 apresentou aumento significativo na atividade enzimática ALP, aproximadamente 34,71 %, em comparação ao grupo DC, demonstrando possíveis alterações hepato-biliares nos animais.

A ALP é uma enzima hidrolítica intracelular que age sobre os fosfoglicerídios ou ésteres fosfóricos, completando a sua degradação com a liberação de fosfato, por isso, alterações na atividade da fosfatase alcalina no soro sanguíneo pode indicar, pelo menos em parte, incapacidade de excreção biliar ou lesões das células hepáticas (Sherlock, 1985; Jong, 1996).

3.2.4 Análise macroscópica dos tecidos

As análises dos tecidos dos animais foram realizadas para avaliação das possíveis alterações ocorridas em decorrência do desenvolvimento tumoral e/ou consumo das dietas contendo semente e farinha fibrosa de chia.

A **Tabela 5** apresenta as médias das massas relativas dos tecidos dos animais por grupo experimental. A massa relativa do coração e dos rins não foi diferente entre os grupos. Entretanto, houve diferença significativa na massa relativa do baço entre os grupos DC ($0,62 \pm 0,07$) e DCDX ($0,33 \pm 0,04$), pois o grupo DC apresentou aumento de 87,88 %. Korekane *et al.* (2003) e Verçosa Júnior *et al.* (2006) relataram o aumento da massa relativa do baço nos animais inoculados com tumor de Ehrlich, e atribuíram este aumento à uma maior atividade hemocaterética.

A função hemocaterética é a atuação do baço na metabolização das células vermelhas do sangue, tendo como principais elementos, os RBC e a HGB (Jamra, 1941). Além disso, aumento do baço está relacionado com o recrutamento e acúmulo de células do sistema imune para este órgão, uma característica do desenvolvimento tumoral. Dessa forma, o baço funciona como um reservatório de células mielóides e linfócitos que podem ser recrutados para o tecido tumoral (Bronte & Pittet, 2013; Talmadge &, 2013 Deronic *et al.*, 2016).

Tabela 5. Massa relativa dos tecidos (massa tecido (g)/massa do animal (g)).

Tecidos	DC	DCDX	DS10	DS15	DS20	DF10	DF15	DF20
Baço	0,62 ± 0,07 ^a	0,33 ± 0,04 ^c	0,45 ± 0,03 ^b	0,56 ± 0,09 ^a	0,51 ± 0,06 ^{ab}	0,48 ± 0,05 ^b	0,48 ± 0,06 ^b	0,40 ± 0,05 ^{bc}
Coração	0,55 ± 0,08 ^a	0,49 ± 0,07 ^a	0,54 ± 0,03 ^a	0,54 ± 0,09 ^a	0,51 ± 0,06 ^a	0,52 ± 0,07 ^a	0,46 ± 0,04 ^a	0,46 ± 0,04 ^a
Fígado	4,02 ± 0,49 ^{abc}	3,75 ± 0,27 ^{bc}	4,21 ± 0,16 ^{ab}	4,20 ± 0,21 ^{ab}	4,32 ± 0,16 ^a	4,06 ± 0,22 ^{ab}	3,63 ± 0,19 ^c	3,65 ± 0,21 ^c
Pulmão	0,64 ± 0,05 ^a	0,51 ± 0,03 ^b	0,56 ± 0,06 ^{ab}	0,54 ± 0,04 ^{ab}	0,55 ± 0,06 ^{ab}	0,53 ± 0,03 ^{ab}	0,57 ± 0,09 ^{ab}	0,55 ± 0,07 ^{ab}
Rins	1,39 ± 0,08 ^a	1,45 ± 0,15 ^a	1,44 ± 0,05 ^a	1,38 ± 0,05 ^a	1,36 ± 0,05 ^a	1,36 ± 0,04 ^a	1,32 ± 0,05 ^a	1,36 ± 0,06 ^a

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão.

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

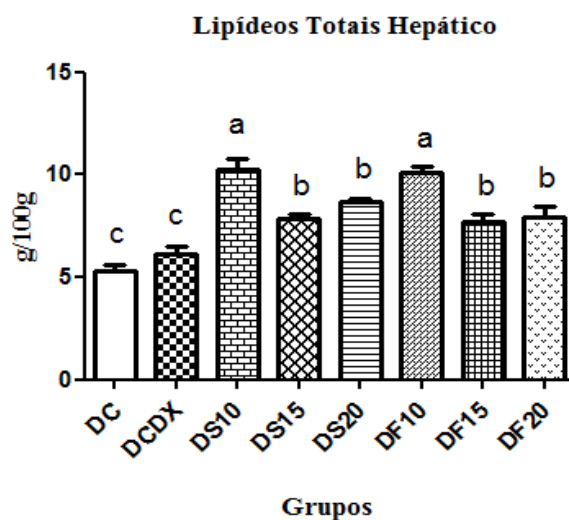


Figura 6. Lipídeos totais hepático dos animais por grupo experimental. DC: controle; DCDX: Doxo (3mg/k, i.p.); DS10, DS15 e DS20: dieta contendo 10 %, 15 % e 20 % de semente de chia; DF10, DF15 e DF20: dieta contendo 10 %, 15 % e 20 % de farinha fibrosa de chia. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. One way ANOVA, seguido de teste de Tukey para comparação dos diferentes grupos ($p < 0,05$).

O grupo DS15 não exibiu diferença significativa na massa relativa do baço com relação ao grupo DC, apresentando maior atividade hemocaterética em comparação com os grupos experimentais de chia (**Tabela 5**). Os grupos DS10, DF10, DF15 e DF20 não exibiram diferença significativa com relação à massa relativa do baço, demonstrando portanto, menor massa em comparação com o grupo DC e maior massa em relação ao grupo DCDX. A redução da massa do baço no grupo DCDX está diretamente relacionada à menor atividade hemocaterética do tecido, devido aos efeitos toxicológicos da DOX, pois conforme observamos na **Tabela 3**, esse grupo apresentou menor concentração de RBC e HCT em comparação aos demais grupos experimentais.

Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais quanto a massa relativa do fígado em comparação com o grupo DC. Do mesmo modo, a massa relativa do pulmão, rins e coração dos grupos experimentais de chia não exibiram diferença estatística com o grupo controle.

Na **Figura 6** são demonstrados os teores de lipídeos totais hepático dos camundongos por grupo experimental, sendo que esses teores foram determinados nesse estudo com objetivo de avaliar a diferença significativa entre as dietas contendo diferente perfil de ácidos graxos e conteúdo de fibras alimentares (**Tabela 1**) no contexto do ensaio experimental com modelo de tumor sólido de Ehrlich.

O conteúdo lipídico hepático é regulado pelo equilíbrio entre absorção dos lipídeos no fígado, síntese, oxidação e exportação, sendo que a absorção dos lipídeos é uma função de distribuição desses substratos para os hepatócitos. Portanto, a qualidade e a quantidade de lipídeos consumidos em uma dieta é o que regula a composição lipídica hepática e a expressão gênica hepática (Perry *et al.*, 2014).

Os grupos DC ($5,30 \pm 0,97$ g/100 g) e DCDX ($6,12 \pm 1,28$ g/100 g) não apresentaram diferença significativa nos teores de lipídeos totais no fígado, portanto a administração da DOX não alterou o conteúdo total de lipídeos. Os grupos que consumiram dietas contendo chia apresentaram significativamente maiores teores de lipídeos totais no fígado em comparação aos grupos com a dieta controle, DC e DCDX, respectivamente. As dietas contendo semente e farinha de chia aumentaram a lipogênese hepática (**Figura 6**). Os grupos DS10 ($10,25 \pm 1,80$ g/100 g) e DF10 ($10,13 \pm 0,85$ g/100 g) apresentaram significativamente maior teor de lipídeos em relação aos grupos DS15, DS20, DF15 e DF20.

Os grupos DS15, DS20, DF15 e DF20 consumiram uma dieta com maior conteúdo de fibra alimentar insolúvel em comparação com o grupo DS10 e DF10

(**Tabela 1**), sendo isso uma das possíveis explicações na redução significativa dos lipídeos totais hepático nesses grupos, pois conforme reportado por Guo *et al.* (2016), as fibras alimentares insolúveis aumentam a excreção fecal dos lipídios através de sua capacidade de se ligar aos mesmos, promovendo assim a redução de seus níveis no fígado dos camundongos.

As fibras alimentares que não são degradadas pelo sistema digestivo enzimático no intestino delgado, quando atingem o intestino grosso, estão disponíveis para várias reações bacterianas fermentativas (Richards *et al.*, 2016). As fibras alimentares solúveis têm maior fermentabilidade e, assim, geram maiores quantidades de SCFA, enquanto que as fibras alimentares insolúveis têm baixa fermentabilidade, por isso contribuem minimamente para a produção de SCFA no cólon (Sivaprakasam *et al.*, 2016).

Os SCFA também contribuem na função reguladora do metabolismo celular dos ácidos graxos, glicose e colesterol. O colesterol tem uma multiplicidade de funções importantes para a sobrevivência dos organismos vertebrados, sendo importante na preservação das estruturas das membranas celulares e em uma variedade de funções vitais nas células, além disso, o colesterol é um precursor importante para a síntese de ácidos biliares, hormônios esteróides e oxisteróis, que são importantes para a manutenção do organismo (Richards *et al.*, 2016).

A **Figura 7** representa os níveis de colesterol total e triglicérides obtidos no fígado dos animais por grupos experimentais. Os grupos, DC e DCDX, não apresentaram diferença significativa para os níveis de colesterol total e triglicérides. Portanto, a administração da DOX, apesar de ter gerado algumas alterações nos parâmetros hematológicos, não alterou os teores de lipídeos, colesterol total e triglicérides no fígado dos animais em comparação ao controle (DC).

Os grupos DS15 ($7,47 \pm 1,22$ mg/100g), DF10 ($6,38 \pm 0,75$ mg/100g) e DF15 ($8,01 \pm 1,04$ mg/100g) não exibiram diferença significativa nos níveis de colesterol total em relação aos grupos DC ($6,41 \pm 0,81$ mg/100g) e DCDX ($6,73 \pm 0,76$ mg/100g). Porém, os grupos DS10 ($21,33 \pm 2,67$ mg/100g), DS20 ($11,06 \pm 0,74$ mg/100g) e DF20 ($10,75 \pm 1,02$ mg/100g) apresentaram maior níveis de colesterol total em relação ao grupo DC (**Figura 7-A**).

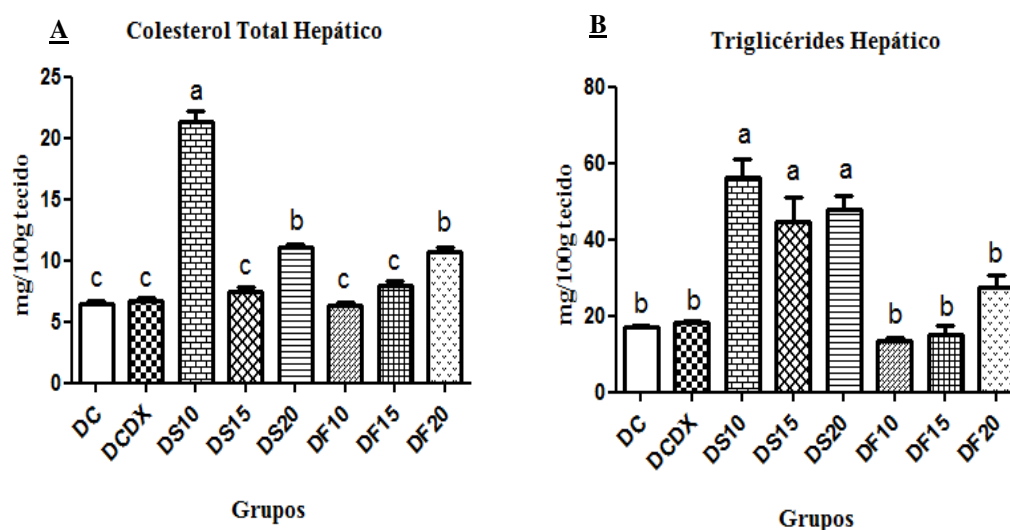


Figura 7. A: Colesterol total hepático dos animais. B: Triglicérides hepático dos animais. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão para os diferentes grupos. DC: controle; DCDX: Doxo (3mg/kg); DS10, DS15 e DS20: dieta contendo 10 %, 15 % e 20 % de semente de chia; DF10, DF15 e DF20: dieta contendo 10 %, 15 % e 20 % de farinha fibrosa de chia. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão One way ANOVA, seguido de teste de Tukey para comparação dos diferentes grupos ($p < 0,05$).

Estudos têm reportado que dietas com baixa proporção ($\omega 6/\omega 3$)-PUFA diminui os níveis de colesterol total, facilita a apoptose e atenua a carcinogênese em ensaios tumorais *in vivo* (Ackerman & Simon, 2014; Dumas *et al.*, 2017;). Entretanto, os grupos que consumiram dieta com semente e farinha de chia não apresentaram redução nos níveis de colesterol hepático em comparação com a dieta controle (DC). Sendo uma das possíveis causas desses níveis superiores podem estar relacionadas ao processo de aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células, gerado pelo crescimento tumoral.

A angiogênese ocorre durante a progressão dos tumores sólidos, porém os vasos sanguíneos tumorais resultantes são muitas vezes desorganizados, e por isso exibem na sua maioria alto níveis de hipoxia tecidual, aumento das ROS, e por consequência o estresse no retículo endoplasmático das células, gerando mudanças na composição lipídica, como o acúmulo de ésteres de colesterol no retículo endoplasmático (Ackerman & Simon, 2014).

Abdel-Rahman *et al.* (2012) relataram que camundongos com tumor sólido de Ehrlich apresentaram redução da catalase e glutathione redutase no tecido tumoral, e aumento significativamente do conteúdo de colesterol total. O carcinoma de Ehrlich têm

sido caracterizado pelo aumento do conteúdo celular de triglicérides e ésteres de colesterol (Ozaslan *et al.*, 2011).

Os grupos que consumiram dieta com farinha fibrosa de chia, DF10 ($13,48 \pm 1,88$ mg/100g), DF15 ($15,02 \pm 6,62$ mg/100g) e DF20 ($27,34 \pm 9,55$ mg/100g), não apresentaram diferença significativa nos níveis de triglicérides em comparação com os grupos, DC ($17,21 \pm 1,16$ mg/100g) e DCDX ($18,16 \pm 1,32$ mg/100g). Porém, os grupos que consumiram sementes de chia exibiram significativamente maiores níveis de triglicérides, DS10 ($56,26 \pm 13,32$ mg/100g), DS15 ($44,59 \pm 18,40$ mg/100g) e DS20 ($47,71 \pm 10,37$ mg/100g), em relação aos grupos experimentais (**Figura 7-B**).

Os grupos que consumiram dieta com semente de chia apresentaram maiores níveis de triglicérides possivelmente devido ao menor consumo de fibras alimentares em sua dieta em relação à dieta contendo farinha fibrosa (**Tabela 1**). Isken *et al.* (2010) demonstraram que camundongos alimentados com maior teor de fibras alimentares provenientes de cereais apresentaram redução nos níveis de triglicérides hepáticos devido ao aumento dos fatores de transcrição e de enzimas que regulam a β -oxidação, a síntese de triacilglicerol e o metabolismo de lipídeos no fígado.

4. CONCLUSÃO

As sementes de chia apresentam elevados teores de ω 3-PUFA, fibras alimentares e compostos fenólicos. O consumo da semente de chia na dieta diminuiu o crescimento da massa tumoral no modelo experimental do tumor sólido de Ehrlich em camundongos machos Balb/C. De acordo com os resultados, os animais tratados com as dietas contendo 10 %, 15 % e 20 % de semente de chia e 20 % de farinha fibrosa de chia apresentaram redução média de 24 % na massa tumoral em comparação com o grupo controle. O consumo diário de dieta contendo semente e farinha fibrosa de chia não promoveu sinais de toxicidade, diferente do grupo tratado com doxorrubicina, que apresentou alterações nos parâmetros hematológicos.

Dessa forma, pode-se concluir que o consumo de semente de chia na dieta, especialmente contendo 10 %, 15 % e 20 % de semente, possui ação preventiva no crescimento de tumores, não apresentando efeitos colaterais. Um dos grandes desafios no controle do câncer é a busca por agentes preventivos, bem aceitos e de fácil acesso à população, desejavelmente sem efeitos colaterais. A semente de chia certamente representa um potencial a ser explorado e estudos futuros serão realizados a fim de confirmar seu potencial preventivo em modelos crônicos de carcinogênese.

5. REFERÊNCIAS

- Abdel-Rahman, M. N., & Kabel, A. M. (2012). Comparative study between the effect of methotrexate and valproic acid on solid Ehrlich tumour. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 24, 161–167.
- Ackerman, D., & Simon, C. (2014). Hypoxia, lipids, and cancer: surviving the harsh tumor microenvironment. *Trends in Cell Biology*, 24(8), 472–478.
- AOAC. (2006). Official Methods of Analysis of AOAC International 18th. Gaithersburg. AOAC International.
- AOCS. (2009). Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. AOCS Press, Champaign, USA.
- Atwater, W. O., & Bryant, A. P. (1900). The availability and fuel value of food materials. Washington, DC: US Government Printing Office, Agriculture Experiment Station, 12th Annual Report, 73–110.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2007). Effect of dietary α -linolenic fatty acid derived from chia when fed as ground seed, whole seed and oil on lipid content and fatty acid composition of rat plasma. *Annals of Nutr. Metabolism*, 51, 27–34.
- Bahr, H. I., Toraih, E. A., Mohammed, E. A., Mohammadc, H. M. F., Ali, E. A. I., & Zaitone, S. A. (2015). Chemopreventive effect of leflunomide against Ehrlich's solid tumor grown in mice: effect on EGF and EGFR expression and tumor proliferation. *Life Sciences*, 141, 193–201.
- Bincoletto, C., Eberlin, S., Figueiredo, C. A. V., Luengo, M. B., & Queiroz, M. L. S. (2005). Effects produced by Royal Jelly on haematopoiesis: relation with host resistance against Ehrlich ascites tumour challenge. *International Immunopharmacology*, 5, 679–688.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *J Biochem Physiol*, 37(8), 911–917.
- BRASIL - ANVISA (2003). RDC 360 - Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*.
- Bronte, V. & Pittet, M. J. (2013). The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity* 39(5), 806–818.
- Cabeza, L., Ortiz, R., Prados, J., Delgado, A. V., Martín-Villena, M. J., Clares, B., Perazzoli, G., Entrena, J. M., Melguizo, C., & Arias, J. L. (2017). Improved antitumor activity and reduced toxicity of doxorubicin encapsulated in poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles in lung and breast cancer treatment: an in vitro and in vivo study. *Europ. Journal of Pharm. Sciences*, 102, 24–34.
- Cagel, M., Grotz, E., Bernabeu, E., Moreton, M. A., & Chiappetta, D. A. (2017). Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. *Drug Discovery Today*, 22(2), 270–281.
- Crawford, M., Galli, C., Visioli, F., Renaud, S., Simopoulos, A. P., & Spector, A. A. (2000). Role of plant-derived omega-3 fatty acids in human nutrition. *Ann Nutr Metab*, 44, 263–265.
- Croft, K. D. (2016). Dietary polyphenols: antioxidants or not. *Arch. of Biochemistry and Biophysics*, 595, 120–124.
- Deronic, A., Leanderson, T., Ivars, F. (2016). The anti-tumor effect of the quinoline-3-carboxamide tasquinimod: blockade of recruitment of CD11b⁺ Ly6C^{hi} cells to tumor tissue reduces tumor growth. *BMC Cancer*, 16:440, 1–15.
- Dumas, J.-F., Brisson, L., Chevalier, S., Mahéo, K., Fromont, G., Moussata, D., Besson, P., & Roger, S. (2017). Metabolic reprogramming in cancer cells, consequences

- on pH and tumour progression: integrated therapeutic perspectives with dietary lipids as adjuvant to anticancer treatment. *Seminars in Cancer Biology*.
- Ehrlich, P. (1906). Experimentelle karzinom-studien an mäuse. *Arch. Insect. Exp. Ther.*, 1, 65.
- Espada, C. E., Berra, M. A., Martinez, M. J., Eynard, A. R., & Pasqualini, M. E. (2007). Effect of chia oil (*Salvia Hispanica*) rich in ω -3 fatty acids on the eicosanoid release, apoptosis and T-lymphocyte tumor infiltration in a murine mammary gland adenocarcinoma. *Prostag., Leuk. and Essential Fatty Acids*, 77, 21–28.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G. H. A. (1957). A simple methods for the insolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol chem*, 226, 497–507.
- Garcia, E., & Winter, C. K. (2017). Chapter 23 – Diet and cancer. *Foodborne Diseases, Third edition*, 459–472.
- Gherman, C., Pileczki, V., Petric, R. C., Braicu, C., Răpuncean, S., & Neagoe, I. B. (2012). In vitro studies for evaluation the antitumoral and immunomodulator effect of EGCG on Ehrlich ascites. *Arch. Zootech.*, 5(2), 79–87.
- Gomes, N. M., Rezende, C. M., Fontes, S. P., Hovell, A. M., Landgraf, R. G., Matheus, M. E., Pinto Ada, C., & Fernandes, P. D. (2008). Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich. *Ehrlich. J Ethnopharmacol*, 119, 179–184.
- Greene, E. R., Huang, S., Serhan, C. H., & Panigrahy, D. (2011). Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostag. Oth. Li. Mediat*, 96(1–4), 27–36.
- Grimm, H., Mayer, K., Mayser, P., & Eigenbrodt, E. (2002). Regulatory potential of n-3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. *Br J Nutr*, 87 (suppl), 59–67.
- Guo, W., Shu, Y., & Yang, X. (2016). Tea dietary fiber improves serum and hepatic lipid profiles in mice fed a high cholesterol diet. *Plant Foods Hum Nutr. Springer Science*.
- Hanahan, D. & R. A. Weinberg (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5), 646–674.
- Hartmann, L., & Lago, R. C. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practices*, 22(8), 475–476.
- Ho, H., Lee, A. S., Jovanovski, E., Jenkins, A. L., DeSouza, R., & Vuksan, V. (2013). Effect of whole and ground Salba seeds (*Salvia Hispanica* L.) on postprandial glycemia in healthy volunteers: a randomized controlled, dose-response trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 67, 786–788.
- Isken, F., Klaus, S., Osterhoff, M., Pfeiffer, A. F. H., & Weickert, M. O. (2010). Effects of long-term soluble vs. insoluble dietary fiber intake on high-fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *Journal of Nut. Biochemistry*, 21, 278–284.
- Iwamoto, L. H., Vendramini-Costa, D. B., Monteiro, P. A., Ruiz, A. L. T. G., Sousa, I. M. O., Foglio, M. A., Carvalho, J. E., & Rodrigues, R. A. F. (2015). Anticancer and anti-inflammatory activities of a standardized dichloromethane extract from *Piper umbellatum* L. leaves *Hindawi Publishing Corporation, Evid.-Based Complem. and Alter. Medicine*, 1–8.
- Jamra, M. (1941). Histologia, fisiologia e patologia do sistema retículo-endotelial. *Revista de Medicina*, Agosto, 21–30.
- Jong, E. V. (1996). Influência de dietas normo e hiperlipídicas sobre o perfil nutricional, parâmetros bioquímicos séricos e estruturais do fígado de ratos Wistar. *Tese de*

Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Ciência da Nutrição, Campinas.

- Kabel, A. M., Abdel-Rahman, M. N., El-Sisi, A. E.-D. E., Haleem, M. S., Ezzat, N. M., & El Rashidy, M. A. (2013). Effect of atorvastatin and methotrexate on solid Ehrlich tumor. *Europ. Journal of Pharmacology*, 713, 47–53.
- Korekane, H., Nishikawa, A., & Imamura, K. (2003). Mechanisms mediating metabolic abnormalities in the livers of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. *Archives of Biochem. and Biophysics*, 412, 216–222.
- Larsson, S. C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M., & Wolk, A. (2004). Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr*, 79, 935–945.
- Lee, H.-C., Liang, A., Lin, Y.-H., Guo, Y.-R., & Huang, S.-Y. (2017). Low dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio prevents induced oral carcinoma in a hamster pouch model. *Prostag., Leuk. and Essential Fatty Acids*.
- Loeb, W. F., & Quimby, F. W. (1999). The Clinical Chemistry of Laboratory Animals. *Clin. Enzymology*, 2 ed., 399–420.
- Marineli, R. S., Lenquiste, S. A., Moraes, E. A., & Maróstica, M. R. J. (2015). Antioxidant potential of dietary chia seed and oil (*Salvia hispanica* L.) in dietinduced obese rats. *Food Res. International*, 76, 666–674.
- Martins, N., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: facts and gaps. *Tr. in Food Sci. & Technology*, 48, 1–12.
- Masana, M. F., Koyanagi, A., Haro, J. M., & Tyrovolas, S. (2017). n-3 Fatty acids, Mediterranean diet and cognitive function in normal aging: a systematic review. *Experim. Gerontology*, 91, 39–50.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56(2), 185–229.
- Miranda-Vilela, A. L., Grisolia, C. K., Longo, J. P. F., Peixoto, R. C. A., Almeida, M. C., Barbosa, L. C. P., Roll, M. M., Portilho, F. A., Estevanato, L. L. C., Bocca, A. L., Bão, S. N., & Lacava, Z. G. M. (2014). Oil rich in carotenoids instead of vitamins C and E as a better option to reduce doxorubicin-induced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice: hematological, toxicological and histopathological evaluations. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25, 1161–1176.
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Bátkai, S., Kashiwaya, Y., Haskó, G., Liaudet, L., Szabó, C., & Pacher, P. (2009). Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 296, H1466–H1483.
- Oliveira-Alves, S. C., Vendramini-Costa, D. B., Cazarin, C. B. B., Maróstica Jr., M. R., Ferreira, J. P. B., Silva, A. B., Prado, M. A., & Bronze, M. R. (2017). Characterization of phenolic compounds in chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, fiber flour and oil. *Food Chemistry*, 232, 295–305.
- Oloris, S. C. S., M. L. Z. Dagli & Guerra, J. L. (2002). Effect of β -carotene on the development of the solid Ehrlich tumor in mice. *Life Sciences* 71, 717–724.
- Ozaslan, M., Karagoz, I. D., Kilic, I. H., & Guldur, M. E. (2011). Ehrlich ascites carcinoma. *African Journal of Biotechnology*, 10(13), 2375–2378.
- Perry, R. J., Samuel, V. T., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2014). The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 510(5), 84–91.

- Pizarro, M. L., Becerra, M., Sayago, A., Beltrán, M., & Beltrán, R. (2013). Comparison of different extraction methods to determine phenolic compounds in virgin olive oil. *Food Anal. Methods*, 6, 123–132.
- Porras-Loaiza, P., Jiménez-Munguía, M. T., Sosa-Morales, M. E., Palou, E., & Lopez-Malo, A. (2014). Physical properties, chemical characterization and fatty acid composition of Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 571–577.
- Poudyal, H., Panchal, S. K., Waanders, J., Ward, L., & Brown, L. (2012). Lipid redistribution by α -linolenic acid-rich chia seed inhibits stearyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23, 153–162.
- Prasad, S., Gupta, S. C., & Tyagi, A. K. (2016). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters*, 387, 95–105.
- Rasband WS. ImageJ, U.S (2012). National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, imagej.nih.gov/ij/, 1997–2012.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey Jr., G. C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 A rodent diet. *Journal of Nutrition*, 123, 1939–1951.
- Reflotron (2010). *Manual de Instruções da Roche Diagnostics*. Roche Diagnostics.
- Richards, L. B., Li, M., van Esch, B. C. A. M., Garssen, J., & Folkerts, G. (2016). The effects of short-chain fatty acids on the cardiovascular system. *Pharma Nutrition*, 4, 68–111.
- Roleira, F. M. F., Tavares-da-Silva, E. J., Varela, C. L., Costa, S. C., Silva, T., Garrido, J., & Borges, F. (2015). Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties. *Food Chemistry*, 183, 235–258.
- Rose, D. P., & Connolly, J. M. (1999). Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharm. & Therapeutics*, 83, 217–244.
- Sherlock, S. (1985). *Diseases of the Liver and Biliary System*. 7th ed. Oxford: Blackwell, 1–59.
- Sivaprakasam, S., Prasad, P. D., & Singh, N. (2016). Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. *Pharm. & Therapeutics*, 164, 144–151.
- Subramani, S., Gajendren, S., Mahadevan, J., Jayachandran, M., Udaiyar, M., & Vinayagam, R. (2014). Ameliorating effect of eugenol on hyperglycemia by attenuating the key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem*, 385, 159–168.
- Swain, T., & Hillis, W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Sci. of Food and Agriculture*, 10(1), 63–68.
- Tacar, O., Sriamornsak, P., & Dass, C. R. (2013). Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65, 157–170.
- Talmadge, J. E. & Gabrilovich, D. I. (2013). History of myeloid derived suppressor cell (MDSCs) in the macro- and micro-environment of tumour-bearing hosts. *Nature Reviews Cancer*, 13(10), 739–752.
- Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., & Altmana, R. B. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet. Genomics*, 21, 440–446.

- Tokudome, S., Kuriki, K., Yokoyama, Y., Sasaki, M., Joh, T., Kamiya, T., Cheng, J., Ogawa, K., Shirai, T., N., I., Goto, C., Tokudome, Y., Ichikawa, H., & Okuyama, H. (2015). Dietary n-3/long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids for prevention of sporadic colorectal tumors: a randomized controlled trial in polypectomized participants. *Prostag., Leuk.s and Essential Fatty Acids*, 94, 1–11.
- Vendramini-Costa, D. B., Francescone, R., Posocco, D., Hou, V., Dmitrieva, O., Hensley, H., Carvalho, J. E., Pilli, R. A., & Grivennikov, S. I. (2017). Anti-inflammatory natural product goniothalamine reduces colitis-associated and sporadic colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 38(1), 51–63.
- Vendramini-Costa, D. B., & Carvalho, J. E. (2012). Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Current Pharm. Design*, 18, 3831–3852.
- Vendramini-Costa, D. B., Castro, I. B. D., Ruiz, A. L. T. G., Marquissolo, C., Pilli, R. A., & Carvalho, J. E. (2010). Effect of goniothalamine on the development of Ehrlich solid tumor in mice. *Bioor. & Medicinal Chemistry*, 18, 6742–6747.
- Verçosa Júnior, D., Souza-Fagundes, E. M., Cassali, G. D., Ribeiro, E. L., Zani, C. L., & Melo, M. M. (2006). Efeito do miriadenolídeo isolado de *Alomia myriadenia* (*Asteraceae*) sobre o tumor de Erlich ascítico no camundongo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58(5), 788–798.
- Wang, D., & Dubois, R. N. (2010). Eicosanoids and cancer *Nat Rev Cancer*, 10(3), 181–193.
- Wang, G., Zhang, J., Liu, L., Sharma, S., & Dong, Q. (2012). Quercetin potentiates doxorubicin mediated antitumor effects against liver cancer through p53/Bcl-xl. *Plos One*, 7(12), e51764.
- Wang, W., Zhu, J., Lyu, F., Panigrahy, D., Ferrara, K. W., Hammock, B., & Zhang, G. (2014). ω -3 Polyunsaturated fatty acids-derived lipid metabolites on angiogenesis, inflammation and cancer. *Prostag. & other Lipid Mediators*, 113–115, 13–20.
- Weng, C.-J., & Yen, G.-C. (2012). Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treatment Reviews*, 38, 76–87.

CAPÍTULO V

**EFEITO DO ÓLEO DE CHIA (*Salvia hispanica* L.) RICO EM ÁCIDO
 α -LINOLÊNICO NO DESENVOLVIMENTO DO TUMOR SÓLIDO DE
EHRlich EM CAMUNDONGOS**

CAPÍTULO V

EFEITO DO ÓLEO DE CHIA (*Salvia hispanica* L.) RICO EM ÁCIDO α -LINOLÊNICO NO DESENVOLVIMENTO DO TUMOR SÓLIDO DE EHRlich EM CAMUNDONGOS

Sheila Cristina de Oliveira Alves¹, Daniel Barrera Arellano³, Renato Grimaldi³, Marcella Stahl³, Mário Roberto Maróstica Júnior⁴, Cinthia Baú Betim Cazarin⁴, Eduardo Augusto Rabelo Socca⁵, Wagner José Favaro⁵, Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz⁶, Fabiana Regina Nonato⁶, Thais Petrochelli Banzato⁶, Karin Maia Monteiro⁶, Sirlene Valerio Tinti⁶, João Ernesto de Carvalho⁶, Débora Barbosa Vendramini-Costa², Marcelo Alexandre Prado¹

¹*Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brasil.*

²*Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-970, Campinas, SP, Brasil.*

³*Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brasil.*

⁴*Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brasil.*

⁵*Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-865, Campinas, SP, Brasil.*

⁶*Divisão de Farmacologia e Toxicologia, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP), 13081-970, Campinas, SP, Brasil.*

* Autor para correspondência: sheilacris@yahoo.com.br

Fone: (19) 3521-0081

Colaborador: mpradofea@gmail.com

Manuscrito será submetido para o periódico Journal of Nutritional Biochemistry.

RESUMO

O óleo da semente de chia possui um elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente ácido α -linolênico e baixa proporção de ($\omega 6/\omega 3$)-PUFA. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do consumo de dieta contendo 5 %, 6 % e 7 % de óleo de chia no desenvolvimento dos tumores sólido de Ehrlich. Trinta camundongos Balb/C machos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (n=6): o grupo controle e o grupo tratado com doxorrubicina foram alimentados com a dieta do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93M), e demais grupos foram alimentados com suas respectivas dietas AIN-93M com adição de 5 %, 6 % e 7 % de óleo de chia, no período de 56 dias. A massa tumoral e histopatologia foram analisadas para avaliar a eficácia do consumo de óleo de chia na redução do crescimento tumoral, enquanto que a toxicidade foi determinada pela massa relativa dos tecidos, parâmetros bioquímicos e hematológicos. O consumo do óleo de chia na dieta reduziu significativamente o crescimento da massa tumoral no modelo de tumor sólido de Ehrlich. De acordo com os resultados, os animais tratados com as dietas contendo 5 %, 6 % e 7 % de óleo de chia apresentaram menores tumores em comparação com o grupo controle, e a atividade antitumoral foi semelhante ao do quimioterápico doxorrubicina. Além da ação antitumoral, o consumo diário da dieta contendo óleo de chia não promoveu sinais de toxicidade, diferente do grupo tratado com doxorrubicina, que apresentou redução da massa corporal final e alterações em parâmetros hematológicos. O consumo das dietas contendo 5 %, 6 % e 7 % de óleo de chia apresentaram redução média de 55 % na massa tumoral em relação ao grupo controle. Dessa forma, pode-se concluir que o consumo de óleo de chia na dieta, especialmente contendo 7 % de óleo de chia, possui ação preventiva contra o crescimento de tumores, não apresentando efeitos colaterais. Um dos grandes desafios no controle do câncer é a busca por novos agentes preventivos, bem aceitos e sem efeitos colaterais. O óleo de chia certamente representa um potencial a ser explorado e estudos futuros serão realizados a fim de confirmar seu potencial preventivo em modelos crônicos de carcinogênese.

Palavras Chave: *Salvia hispanica*, ácido α -linolênico, tumor sólido de Ehrlich, prevenção.

ABSTRACT

Chia seed oil has a high content of polyunsaturated fatty acids, mainly α -linolenic acid, and low ratio of (ω 6: ω 3)-PUFA. The objective of this study was to evaluate the effects of the consumption of diets containing 5 %, 6 % and 7 % of chia oil in the development of Ehrlich solid tumors. Thirty male Balb/C mice were randomized into five groups (n = 6): the control group and the doxorubicin group were fed with the American Institute of Nutrition (AIN-93M) diet, and other groups were fed with their respective AIN-93 diets added with 5 %, 6 % and 7 % of chia oil, during a period of 56 days. Tumor mass and tumor histopathology were analyzed to evaluate the efficacy of chia oil consumption in reducing tumor growth, while toxicity was determined by the relative mass of the tissues, biochemical and hematological parameters. The consumption of chia oil in the diet significantly reduced the tumor mass grown in the Ehrlich solid tumor model. According to the results, the animals treated with the diets containing 5 %, 6 % and 7 % of chia oil presented smaller tumors in comparison with the control group, and the antitumor activity was similar to that of the chemotherapeutic doxorubicin. Besides the antitumor action, the daily consumption of chia oil did not demonstrate signs of toxicity, unlike the doxorubicin group, which presented a reduction in the final body mass and changes in hematological parameters. The consumption of the diets containing 5 %, 6 % and 7 % of chia oil promoted an average reduction of 55 % in the tumor mass in relation to the control group. Thus, it can be concluded that the regular consumption of chia oil in the diet, especially containing 7 % of chia oil, has preventive action against the growth of tumors, with no side effects. One of the great challenges in the control of cancer is the search for new preventive agents, that are well accepted and without side effects. Chia oil certainly has great potential to be explored and future studies will be carried out to confirm its potential preventive action in chronic models of carcinogenesis.

Keywords: *Salvia hispanica*, α -linolenic acid, Ehrlich solid tumor, prevention.

1. INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) desempenham um papel importante na prevenção e tratamento de doenças não transmissíveis (DNT), também conhecidas como doenças crônicas, tais como hipertensão, doença da artéria coronária, diabetes e câncer, entretanto o consumo elevado de alimentos com alto teor de ácidos graxos saturados (SFA) tem sido relacionado como uns dos principais fatores no desenvolvimento das doenças crônicas (Wang *et al.*, 2014; Masana *et al.*, 2017).

Os PUFA estão abundantemente presentes em peixes marinhos, algas e algumas sementes oleaginosas, sendo que os PUFA contidos nos óleos vegetais, em geral são ácidos graxos de cadeia curta, tais como o ácido α -linolênico (ALA, C18:3 ω -3) e ácido linoléico (LA, C18:2 ω -6), enquanto que os óleos de peixes contêm PUFA de cadeia longa (Timilsena *et al.*, 2017).

A chia (*Salvia hispanica* L.) é uma semente oleaginosa, pertencente à família *Lamiaceae*, nativa do sul do México e norte da Guatemala. O óleo da semente de chia possui um elevado teor de PUFA, principalmente ALA (~60 %), baixo teor de SFA e baixa proporção de (ω 6/ ω 3)-PUFA (Ixtaina *et al.*, 2015). Porém, o óleo de chia apresenta baixa atividade antioxidante, uma vez que os compostos fenólicos presentes na semente são na sua maioria de natureza hidrofílica (Oliveira-Alves *et al.*, 2017).

Os PUFA presentes nos óleos vegetais exercem efeitos antitumorais, afetando talvez a expressão gênica ou ativando moléculas de transdução de sinal envolvidas no controle do crescimento celular, diferenciação, apoptose, angiogênese e metástase (Espada *et al.*, 2007). Além disso, o alto consumo de PUFA, especificamente os ácidos graxos ômega 3 (ω 3-PUFA), podem contribuir para redução dos processos inflamatórios crônicos envolvidos no desenvolvimento de muitos tumores (Vendramini-Costa & Carvalho, 2012).

Estudos apontam os ω 3-PUFA e seus metabólitos oxidativos como potenciais agentes anti-inflamatórios e anticancerígenos, especialmente nas áreas do intestino grosso, onde a influência de substâncias oralmente introduzidas é alta, onde os tumores têm apresentado padrões de PUFA desordenados (Miccadei *et al.*, 2016). Em geral, estudos relatam que o metabolismo dos PUFA desempenha um papel na inflamação impulsionada pela carcinogênese colorretal e é provavelmente influenciado pelo tamanho do tumor, pois proporções altas de (ω 6/ ω 3)-PUFA nas dietas resultam em um efeito pró-inflamatório (Simopoulos, 2008; Miccadei *et al.*, 2016).

Estudos experimentais em camundongos, têm reportado a ação antitumoral dos óleos vegetais em modelos de câncer induzido (Espada *et al.*, 2007; Miranda-Vilela *et al.*, 2014). No entanto, o efeito do consumo de ω 3-PUFA e ω 6-PUFA em uma dieta em várias proporções em um modelo experimental de câncer tem sido pouco explorado. Estudos têm relatado que os ω 3-PUFA e ω 6-PUFA competem na mesma enzima; assim, o equilíbrio de ω 3-PUFA e ω 6-PUFA é muito mais crítico do que os seus teores individuais (Welch *et al.*, 2010; Colussi *et al.*, 2017).

A busca por agentes preventivos e terapêuticos na prevenção e controle do câncer ainda representa um desafio, devido às características peculiares de cada tipo de câncer, mecanismos de resistência e a indução dos efeitos colaterais pelos tratamentos aplicados (Vendramini-Costa *et al.*, 2017). Portanto, agentes preventivos e de fácil acesso para população, tais como agentes incorporados à dieta, se faz necessário e neste contexto o óleo de chia representa uma alternativa promissora.

Assim, neste estudo, avaliamos o efeito do óleo de chia incorporado à dieta, contendo várias proporções de (ω 6/ ω 3)-PUFA em modelo de tumor sólido de Ehrlich, adenocarcinoma mamário murino, caracterizado por crescimento rápido e agressivo (Oloris *et al.*, 2002).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados para caracterização das dietas foram o ácido clorídrico e metanol adquiridos da Chemco (Campinas, SP, Brasil); ácido sulfúrico concentrado, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio e isopropanol da Dinâmica (Diadema, SP, Brasil); ácido bórico, carbonato de sódio, sulfato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de amônio, clorofórmio, acetona e éter de petróleo da Synth (Diadema, SP, Brasil). O hexano grau HPLC (Macron, EUA) e ésteres metílicos do C₄ ao C₂₄ (FAME Mix, Supelco, EUA). O fármaco, cloridrato de doxorrubicina (50 mg), foi adquirido da Europharma (São Paulo, SP, Brasil).

2.2 Equipamentos

Balança semi-analítica (Marca BEL, São Paulo, Brasil), balança analítica (Shimadzu, Modelo AY220, Barueri, Brasil), estufa de secagem industrial (Nova Técnica, Modelo NT513, Piracicaba, SP, Brasil), agitador de tubos (Labnet, modelo S0200, EUA), bloco digestor (Marconi, MA 4025, Piracicaba, SP, Brasil), destilador de

nitrogênio (Tecnal, TE 40-25), analisador hematológico (PocH-100 iv Diff, Curitiba, PR, Brasil), microcentrífuga para eppendorf (Eppendorf North América, modelo 5415C, Westbury, USA), analisador bioquímico automatizado Reflotron plus (Roche, Reflotron plus, EUA), leitor de microplacas (Synergy HT, Biotek, Winooski, USA), cromatógrafo gasoso capilar (CGC Agilent 6850, EUA), micrótomo rotativo Biocut 1130 (Reichert-Jung, Munique, Alemanha) e microscópio óptico acoplado à uma câmera de vídeo (Leica DM2500, Wetzlar, Alemanha).

Os experimentos *in vivo*, as análises hematológicas e bioquímicas foram realizados na Divisão de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP). As análises histológicas do tumor foram realizadas no Departamento de Biologia Estrutural e Funcional (Instituto de Biologia, UNICAMP). As análises de caracterização das dietas e dos tecidos dos animais foram realizadas na Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA/UNICAMP).

2.3 Animais

Os experimentos foram realizados em camundongos Balb/C obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica-UNICAMP (CEMIB) com 3 semanas de idade. Os camundongos Balb/C (20-30 g) foram mantidos no biotério da Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/UNICAMP, em salas com temperatura controlada de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 50 a 60 % ± 5 %, e em ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso livre à água e dieta. Os cuidados dos animais bem como os protocolos de pesquisa estão de acordo com os princípios e diretrizes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo comitê de ética em pesquisa animal do Instituto de Biologia – UNICAMP (nº. 3192-1), **Anexo 1**.

2.4 Elaboração das dietas

As dietas foram elaboradas de acordo com a *American Institute of Nutrition* (Reeves *et al.*, 1993). Os ingredientes foram adquiridos da Rhoester Indústria e Comércio Ltda. (Campinas, SP, Brasil) para elaboração das dietas. A dieta AIN-93M foi modificada para os teores de proteínas de 18 % e lipídeos de 7 %. Após a preparação, as dietas foram embaladas em sacos escuros de polietileno e armazenadas a -20 °C para minimizar a oxidação dos ácidos graxos. Os grupos experimentais foram

divididos em: AIN-93M como dieta controle (DC), AIN-93M contendo 5 % de óleo de chia e 2 % de óleo de soja (DO5), AIN-93M contendo 6 % de óleo de chia e 1 % de óleo de soja (DO6) e AIN-93M contendo 7 % de óleo de chia (DO7).

2.5 Análises das dietas

2.5.1 Composição centesimal

A composição centesimal das dietas foi determinada quanto ao teor de umidade, cinzas, proteínas (AOAC, 2006) e lipídeos (Bligh & Dyer, 1959). O teor de carboidratos foi determinado por diferença de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 360 (BRASIL, 2003). O valor de energia foi determinado utilizando-se o fator de Atwater (Atwater & Bryant, 1900).

2.5.2 Perfil dos ácidos graxos

A extração lipídica das dietas foi realizada segundo método de Bligh & Dyer (1959), utilizando agitador de tubos (Labnet, modelo S0200, EUA). A composição dos ácidos graxos presentes na fração lipídica das dietas foi determinada por cromatografia gasosa, após esterificação, utilizando a metodologia descrita por Hartmann & Lago (1973). Os ésteres metílicos foram separados segundo o método AOCS Ce 2-66 (2004), analisados em cromatógrafo gasoso capilar (marca CGC Agilent 6850 Series GC System) com detector de ionização de chama.

Os componentes foram separados em coluna capilar de sílica fundida DB-23 Agilent (50 % cianopropil metil polisiloxano modificado) com dimensões de 60 m, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 0,25 µm. As condições de operação foram fluxo de 1,00 mL/min, temperatura programada do detector de 280 °C, temperatura do injetor a 250 °C, temperatura do forno: 110 °C – 5 min.; 110 – 215 °C – 5 min, 215 °C – 24 min., gás de arraste: hélio; velocidade linear do gás de arraste de 24 cm/s, volume injetado de 1,0 µL. A identificação e quantificação dos ácidos graxos foi realizada através da comparação do tempo de retenção dos ácidos graxos das amostras e dos padrões. As análises cromatográficas foram realizadas em duplicata.

2.6 Tumor sólido de Ehrlich

2.6.1 Preparação das células

As células de tumor de Ehrlich foram mantidas na sua forma ascítica, no peritônio dos camundongos, por passagens semanais com 5×10^5 células/animal. Para procedimento, as células foram descongeladas, ressuspensas em PBS e centrifugadas por 5 minutos a 2500 rpm (*Centrifuge* 5403, Eppendorf®, 4°C, EUA). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular novamente ressuspendido em PBS, em volume suficiente para preparar a suspensão celular na densidade de inoculação de 5×10^5 células/animal. Dois animais foram inoculados (doadores), e após cinco ou seis dias, foram sacrificados. O líquido ascítico foi coletado e submetido à processamento, para preparo da suspensão de manutenção da linhagem ou para preparo da suspensão do estudo (Gomes *et al.*, 2008; Vendramini-Costa *et al.*, 2010).

2.6.2 Inoculação das células tumorais no dorso dos animais

Para realização do experimento, foram utilizados 30 camundongos machos da linhagem BALB/c (n=6/ por grupo). Os camundongos foram divididos aleatoriamente em cinco grupos: dieta controle AIN-93M (DC), controle doxo (dieta DC e tratamento com doxorubicina – Europharma® 3 mg/kg – dieta DCDX), e os grupos com as dietas AIN-93M com adição de 5 % (DO5), 6 % (DO6) ou 7 % (DO7) de óleo de chia. Portanto, os animais foram pré-alimentados com as dietas por 35 dias antes do inóculo das células. No 36º dia, as células foram preparadas na densidade de 5×10^6 células/animal, em PBS com pH 7, e inoculados 60 µL/animal no tecido celular subcutâneo do dorso do animal (flanco), de acordo com Iwamoto *et al.* (2015).

As dietas foram utilizadas ao longo de todo o experimento. A variação da massa corporal foi determinada através da pesagem dos animais a cada três dias desde da introdução das dietas. A partir do 39º dia os animais do grupo doxo (DCDX) foram tratados intraperitonealmente a cada três dias com a doxorubicina (3 mg/kg). No 56º dia, os camundongos foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia para a retirada do tumor e dos tecidos (rins, fígado, baço, coração e pulmão), os quais foram pesados e avaliados macroscopicamente. Os fígados foram armazenados em ultrafreezer (Revco, ULT1386-3-D36, Asheville, EUA). Os tumores foram armazenados em solução de formol tamponada neutra a 10 % para posterior análise.

2.6.3 Delineamento experimental antitumoral

Foram utilizados grupos experimentais para avaliar a atividade antitumoral do óleo de chia em camundongos Balb/C machos (**Figura 1**). No experimento foram

utilizados 36 camundongos machos da linhagem Balb/C. O ensaio sadio utilizou um grupo (n=6) de camundongos machos Balb/C e o ensaio tumoral utilizou 30 camundongos Balb/C machos que foram aleatoriamente divididos em cinco grupos (n=6/ por grupo) e receberam as seguintes dietas:

A) Ensaio Sadio:

- Grupo sadio: Dieta controle (DC Sadio) – dieta padrão controle AIN-93M;

B) Ensaio tumoral:

- Grupo I: Dieta controle (DC) – dieta controle AIN-93M;
- Grupo II: Dieta Doxo (DCDX) – dieta controle AIN-93M com tratamento de doxorrubicina (3 mg/kg) tratados intraperitonealmente;
- Grupo III: Dieta com óleo de chia (DO5) – dieta com adição de 5 % (m/m) de óleo de chia e 2 % (m/m) de óleo de soja;
- Grupo IV: Dieta com óleo de chia (DO6) – dieta com adição de 6% (m/m) de óleo de chia e 1 % (m/m) de óleo de soja;
- Grupo V: Dieta com óleo de chia (DO7) – dieta com adição de 7 % (m/m) de óleo de chia.

O grupo controle sadio (n=6) foi pré-alimentado com dieta controle AIN-93M (DC) no período de 56 dias sem inoculação do tumor, sendo utilizado como referência para avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos grupos com tumor sólido de Ehrlich.

O experimento *in vivo* foi realizado no período total de 56 dias no biotério da Divisão de Farmacologia e Toxicologia – CPQBA – UNICAMP, em salas com temperatura controlada de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 50 a 60 % ± 5 %, e em ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso livre à água e dieta.

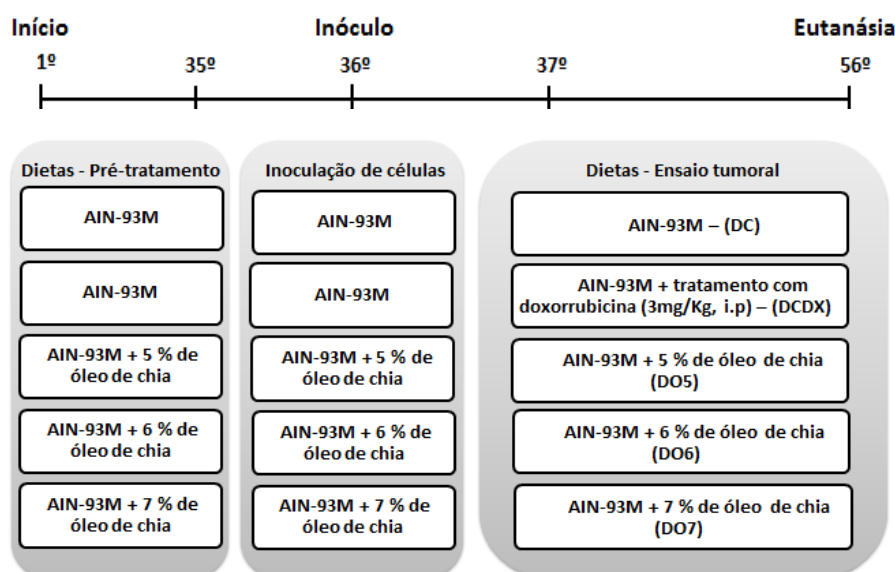


Figura 1. Esquema ilustrativo do ensaio tumoral.

2.7 Avaliações dos animais

2.7.1 Massa corporal

A quantidade de dieta consumida por grupo foi avaliada por meio do registro diário da ingestão alimentar dos animais (variação entre a oferta e as sobras da dieta deixadas nas gaiolas) durante os 56 dias de ensaio, para obtenção da ingestão nos diferentes grupos experimentais. Durante todo período experimental, os animais foram submetidos semanalmente à avaliações de massa corporal, de forma a minimizar a manipulação e estresse dos animais.

2.7.2 Eutanásia dos animais

No final do período experimental, após jejum de 8 horas, todos os animais foram pesados, anestesiados (100 mg/kg ketamina + 5 mg/kg xilazina). Em seguida o sangue foi coletado por punção cardíaca e os animais foram submetidos a eutanásia por aprofundamento de anestesia. O sangue de cada animal foi distribuído em microtubo de 0,5 mL contendo 10 µL de anticoagulante EDTA sódico a 10 % para realização dos parâmetros hematológicos e em um microtubo de 1,0 mL sem EDTA para centrifugação do soro e posterior realização das análises bioquímicas.

Após 56 dias, os animais foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia, sendo avaliado o perfil hematológico e as funções hepáticas, por meio de

análises bioquímicas dos níveis séricos de gama-glutamilttransferase (GGT), aspartato aminotransferase (TGO), alanina aminotransferase (TGP) e fosfatase alcalina (ALP). Os tecidos (fígado, rins, coração, pulmão e baço) foram retirados e pesados. Os fígados foram armazenados em ultrafreezer (Marca Revco, modelo ULT1386-3-D36) para serem analisados. Os tumores foram armazenados em solução de formol tamponada neutra a 10 % para posterior análise.

2.7.3 Avaliação dos parâmetros sanguíneos

O sangue coletado em microtubos com EDTA (0,5 mL de sangue para 10 µL de EDTA) foi lido em aparelho veterinário para análise de hemograma (Sysmex®, modelo pocH-100iV, Curitiba, PR, Brasil), avaliando-se: leucócitos totais (WBC), eritrócitos (RBC), hemoglobina (HGB), hematócitos (HCT) e plaquetas (PLT).

2.7.4 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

A determinação dos parâmetros bioquímicos foi realizada no soro, portanto os microtubos de 1,0 mL foram centrifugados durante 15 min a 3500 rpm, o sobrenadante (soro) foi coletado em microtubo e armazenado a 10 °C para posterior análise. Os parâmetros bioquímicos foram dosados através do analisador automatizado Reflotron (Roche, Reflotron plus, EUA), empregando o método cinético UV, utilizando *kits* comerciais de reagentes padrão (Roche, EUA).

Todas as medidas de atividade enzimática foram visualizadas para a temperatura 37 °C. Uma alíquota de 30 µL de soro de cada animal foi inserida no centro da zona vermelha reativa da tira, removendo anteriormente a banda protetora. Após 15 s a tira foi introduzida horizontalmente no aparelho e o aparecimento no visor confirma a leitura do código magnético específico do teste. Os parâmetros bioquímicos analisados foram gama-glutamilttransferase (GGT), aspartato aminotransferase (TGO), alanina aminotransferase (TGP) e fosfatase alcalina (ALP).

2.7.5 Peso relativo dos tecidos

Após eutanásia, de cada animal, foram excisados os seguintes tecidos (coração, fígado, rins, baço e pulmão), foram pesados em balança analítica. Os fígados foram separados em frascos, identificados e armazenados em ultrafreezer (Marca Revco, modelo ULT1386-3-D36) para análises posteriores.

2.7.6 Análises histológicas do tumor

Os tumores dos animais dos grupos experimentais foram removidos e armazenados em solução de formol tamponado a 10 % por 24 hs, após esse período, seguiu-se a desidratação progressiva com série crescente de etanol: etanol 70°, etanol 80°, etanol 100°, xilol e inclusão em parafina. Os cortes foram realizados no micrótomo rotativo Biocut 1130 (Reichert-Jung, Munique, Alemanha), 5 µm de espessura. Para realizar a coloração, os cortes foram desparafinizados em série de xilol e reidratados em concentrações decrescentes de etanol. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para análise das áreas de necrose na massa tumoral.

2.7.6.1 Área de necrose

Para avaliação da área de necrose utilizou-se o sistema de análise de imagens computadorizada (Leica LAS X Core, Wetzlar, Alemanha) do Laboratório do Instituto de Biologia da UNICAMP. Esse sistema compõe-se de um microscópio óptico acoplado à uma câmera de vídeo (Leica DM2500, Wetzlar, Alemanha) e um computador com placa digitalizadora. As áreas de necrose em meio a massa tumoral foram observadas no microscópio utilizando objetivas de 10x e 50x. A área de necrose foi quantificada utilizando-se o *software* ImageJ 1.46r (Bethesda, Maryland, USA) por meio da equação [% área de necrose = (área de necrose/ área total (área de necrose + área de tumor)) *100].

2.8 Análises hepáticas

2.8.1 Teor de lipídeos totais

O teor de lipídeos totais nos fígados dos animais foi determinado utilizando a metodologia de extração de lipídeos totais em tecido animal (Folch *et al.*, 1957) em triplicata. Adicionou-se 1,9 mL de clorofórmio: metanol (2:1,v/v) em 0,1 g de fígado fresco, misturou-se e submeteu-se à trituração. Assim, uma alíquota de 0,4 mL de metanol PA foi adicionada e depois centrifugada a 3500 rpm durante 10 min.

O sobrenadante foi recolhido, adicionado 0,8 mL de clorofórmio, 0,64 mL de solução de NaCl a 0,73 % e em seguida foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e na fase inferior foi realizada a adição de 1 mL de solução de Folch (clorofórmio:metanol:água:NaCl 0,2% - 3:48:47:2, v/v/v/v), sendo lavada por três vezes. Sendo assim, em seguida foi adicionado 5 mL de clorofórmio:metanol (2:1, v/v), e o conteúdo foi seco em estufa a 37 °C por 8 hs. O teor

de lipídeos totais da amostra foi determinado. O conteúdo seco foi ressuspense em 1 mL de isopropanol para as análises posteriores dos níveis hepático de colesterol total e triglicérides.

2.8.2 Análise do colesterol total e triglicérides

Os níveis hepático de colesterol total e triglicérides foram determinados utilizando kits de ensaio enzimático, de acordo com as instruções do fabricante para os respectivos kits (Colestat enzimático AA e TG color GPO/PAP AA, Wiener laboratories, Rosario, Argentina). Para tanto foi utilizado o material seco resultante do processamento do fígado (procedimento descrito em 2.8.1) ressuspense em 1 mL de isopropanol.

2.9 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão, avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação de média, o teste de Tukey. Valores de p menores do que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os cálculos foram realizados utilizando o *Software* estatístico *GraphPad Prism* versão 5.0 (San Diego Califórnia, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Dietas experimentais

O óleo de chia possui elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), principalmente ômega-3 (ω 3-PUFA) e ômega-6 (ω 6-PUFA), e baixo teor de ácidos graxos saturados (SFA). Os PUFA desempenham um papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, entretanto o corpo humano é incapaz de sintetizar PUFA em quantidade necessária, os quais são conhecidos como os ácidos graxos essenciais (Souza & Visentainer, 2012; Timilsena *et al.*, 2017). Portanto os mesmos devem ser fornecidos ao corpo humano através de dieta ou suplemento alimentar.

A **Tabela 1** apresenta a composição química e teor dos ácidos graxos das dietas experimentais. As dietas experimentais elaboradas são isocalóricas, apresentando em média $4085,12 \pm 4,95$ kcal/kg, com 18 % de proteínas e 7 % de lipídeos totais. As dietas DO5, DO6 e DO7 apresentam elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados e baixa proporção (ω -6/ ω -3)-PUFA em comparação com a dieta DC.

Tabela 1. Ingredientes e composição das dietas experimentais.

	DC	DO5	DO6	DO7
<i>Ingredientes (g/kg dieta)</i>				
Caseína ^a	200	200	200	200
Maltodextrina	155	155	155	155
Amido de milho	375,692	375,692	375,692	375,692
Sacarose	100	100	100	100
Óleo de soja	70	20	10	0
Óleo de chia	0	50	60	70
Celulose	50	50	50	50
Mineral mix (AIN-93M-MX)	35	35	35	35
Vitamina mix (AIN-93-VX)	10	10	10	10
L-Cistina	1,8	1,8	1,8	1,8
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>tert</i> -Butil hidroquinona	0,008	0,008	0,008	0,008
<i>Composição (g/kg dieta)</i>				
Proteínas totais (g/kg dieta)	183,70 ± 0,37	182,90 ± 0,31	183,20 ± 0,30	182,50 ± 0,32
Lipídeos totais (g/kg dieta)	71,40 ± 0,07	72,27 ± 0,05	72,15 ± 0,07	72,40 ± 0,03
Carboidratos totais (g/kg dieta)	675,20 ± 0,14	675,90 ± 0,15	676,70 ± 0,09	676,90 ± 0,12
Energia (kcal/kg dieta)	4078,20 ± 0,49	4085,00 ± 0,27	4088,00 ± 0,32	4089,30 ± 0,39
<i>Ácidos graxos (g/kg dieta)</i>				
Palmítico (C16:0)	12,21 ± 0,13	9,44 ± 0,03	9,15 ± 0,05	8,76 ± 0,05
Esteárico (C18:0)	4,12 ± 0,06	4,94 ± 0,05	4,75 ± 0,09	4,47 ± 0,08
Oléico (C18:1 ω -9)	25,80 ± 0,09	13,70 ± 0,06	10,62 ± 0,08	7,82 ± 0,12
Linoléico (C18:2 ω -6)	49,76 ± 0,15	27,21 ± 0,03	22,71 ± 0,07	18,18 ± 0,09
α -Linolênico (C18:3 ω -3)	5,44 ± 0,05	44,25 ± 0,12	52,37 ± 0,12	58,80 ± 0,14
SFA total	18,31 ± 0,13	14,68 ± 0,04	14,65 ± 0,07	14,87 ± 0,09
MUFA total	26,25 ± 0,10	13,86 ± 0,01	10,27 ± 0,03	8,15 ± 0,07
PUFA total	55,45 ± 0,23	71,46 ± 0,03	75,08 ± 0,04	76,98 ± 0,11
PUFA/SFA	3,03 ± 0,01	4,87 ± 0,01	5,12 ± 0,01	5,18 ± 0,01
(ω -6/ ω -3)-PUFA razão	9,14 ± 0,01	0,61 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,31 ± 0,03

Grupo DC: AIN-93M dieta padrão controle; Grupo DO5: 5 % (m/m) de óleo de chia na dieta;

Grupo DO6: 6 % (m/m) de óleo de chia na dieta; DO7: 7 % (m/m) de óleo de chia na dieta.

SFA: ácidos graxos saturados; MUFA: ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: ácidos graxos poli-insaturados.

^a Cálculo baseado no conteúdo de proteínas igual a 86 % para fornecer 18 g de proteínas/100g de dieta.

Uma das considerações importantes na seleção de uma fonte ideal de PUFA é a proporção de ω 6-PUFA e ω 3-PUFA no óleo vegetal, pois grande parte dos alimentos ocidentais são altamente processados com óleos vegetais ricos em ω 6-PUFA e deficientes em ω 3-PUFA, causando assim um desequilíbrio grave na proporção da ingestão de ω 6-PUFA e ω 3-PUFA (De Silva *et al.*, 2011).

Atualmente, o desenvolvimento de doenças crônicas, como hipertensão, doença da artéria coronária, distúrbios neurológicos, diabetes e câncer tem sido correlacionado com o desequilíbrio da ingestão de ω 6-PUFA e ω 3-PUFA pela população (Khan & He, 2017; Messamore *et al.*, 2017; Timilsena *et al.*, 2017). Estudos têm demonstrado que ingestão de dietas com baixa proporção (ω -6/ ω -3)-PUFA em modelos de investigação de câncer tem apresentando significativamente menor crescimento da massa tumoral (Espada *et al.*, 2007; Miranda-Vilela *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2017).

3.2 Ensaio antitumoral

3.2.1 Massa corporal e parâmetros de consumo

A variação da massa corporal dos animais no modelo experimental (**Figura 2**) apresentou, no período de pré-tratamento (1º ao 35º dia) com as dietas, o comportamento crescente de ganho de massa em todos os grupos experimentais, portanto as dietas experimentais não apresentaram diferença significativa quanto ao ganho de massa corporal.

As células tumorais, do modelo tumoral sólido de Ehrlich, foram inoculadas no tecido subcutâneo do flanco dos animais no 36º dia e o desenvolvimento tumoral foi acompanhado do 36º dia ao 56º dia, bem como os sinais clínicos dos animais.

De acordo com a **Figura 2**, observa-se um declínio na média da massa corporal dos animais a partir do 50º dia em todos os grupos experimentais devido ao estresse oxidativo gerado pelo crescimento tumoral. Entretanto a variação da massa corporal no período do 36º dia ao 50º dia não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais ($p > 0,05$).

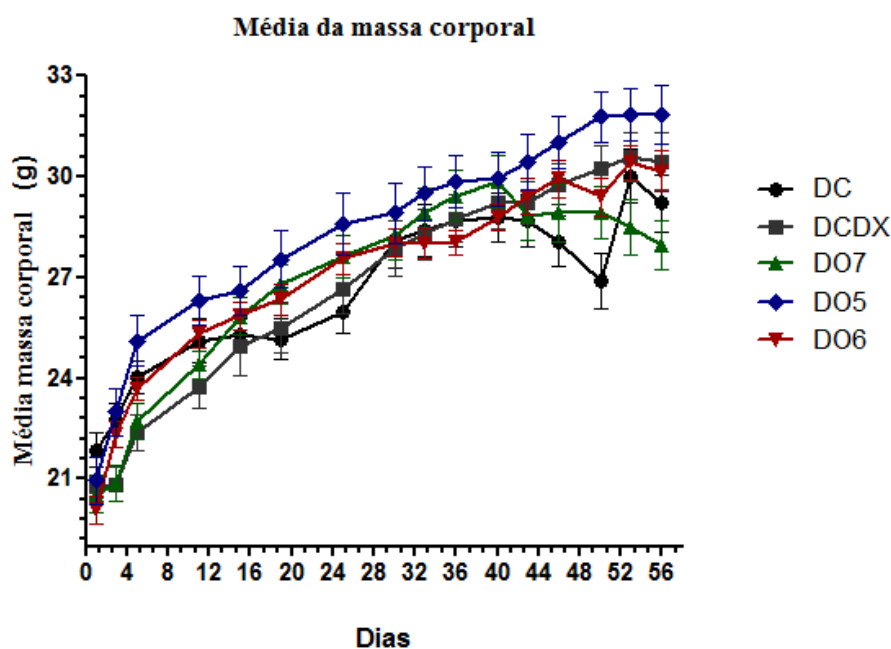


Figura 2. Variação da massa corporal nos grupos experimentais ao longo de 56 dias de experimento. O inóculo do tumor sólido de Ehrlich foi realizado no 36º dia. Os resultados são expressos como média da massa corporal (g) para os diferentes grupos. DC: controle; DCDX: Doxo (3mg/Kg, i.p.); DO7, DO6 e DO5: dieta contendo 7 %, 6 % e 5% de óleo de chia. One way ANOVA, seguido de teste de Tukey para comparação dos diferentes grupos ($p < 0,05$).

Tabela 2. Crescimento e parâmetros de consumo alimentar dos animais.

Parâmetros	DC	DCDX	DO5	DO6	DO7
Massa corporal inicial (g)	21,87 ± 1,50 ^a	20,76 ± 1,71 ^a	20,95 ± 1,42 ^a	20,09 ± 1,84 ^a	20,56 ± 1,47 ^a
Massa corporal final (g)	29,43 ± 1,78 ^a	25,83 ± 2,12 ^b	29,97 ± 2,43 ^a	28,32 ± 1,54 ^{ab}	27,41 ± 2,09 ^{ab}
Ganho massa corporal (g/dia)	0,14 ± 0,02 ^a	0,09 ± 0,02 ^b	0,16 ± 0,03 ^a	0,15 ± 0,02 ^a	0,13 ± 0,01 ^a
Consumo da dieta (g/dia)	3,30 ± 0,39 ^a	3,18 ± 0,50 ^a	3,26 ± 0,63 ^a	3,56 ± 0,47 ^a	3,81 ± 0,73 ^a
Consumo da dieta (Kcal/dia)	13,46 ± 0,51 ^a	12,97 ± 0,51 ^a	13,31 ± 0,87 ^a	14,55 ± 0,94 ^a	15,57 ± 0,52 ^a
Índice de eficiência alimentar*	0,04 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,01 ^a

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão.

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

* Índice de eficiência alimentar = (ganho massa corporal dia/consumo dia).

Não houve diferença significativa da massa corporal final dos grupos DO5, DO6 e DO7 com relação ao grupo DC. Os animais tratados com doxorubicina (grupo DCDX) apresentaram massa corporal final (56º dia) reduzida (12,23 %) em comparação ao grupo DC, sendo que essa redução não está associada ao consumo diário da dieta.

Não houve diferença significativa nos parâmetros de consumo diário, indicando assim que as dietas são isocalóricas e bem aceitas pelos grupos (**Tabela 2 e Figura 3**).

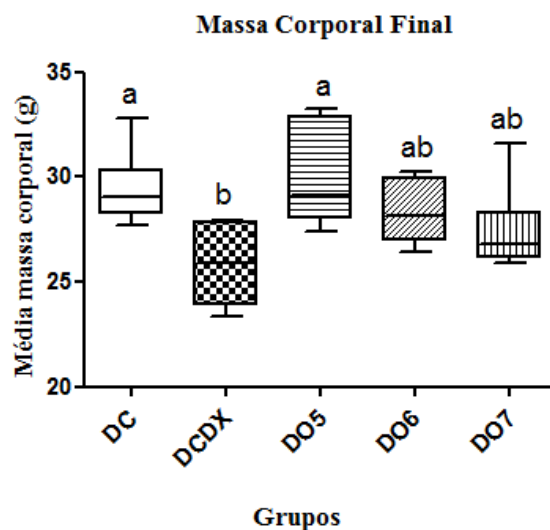


Figura 3. Massa corporal final (g), após 56 dias de experimento, para os diferentes grupos. DC: controle; DCDX: Doxo (3 mg/kg, i.p.); DO7, DO6 e DO5: dieta contendo 5 %, 6 % e 7 % de óleo de chia. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. One way ANOVA, seguido de teste de Tukey para comparação dos diferentes grupos ($p < 0,05$).

A redução significativa da massa corporal final do grupo DCDX está diretamente relacionada com a administração intraperitoneal da doxorubicina (DOX), que é um antibiótico do grupo das antraciclinas com elevado efeito antineoplásico, sendo utilizado principalmente em tratamentos de tumores sólidos, porém sua aplicação é limitada devido aos efeitos colaterais, que incluem cardiotoxicidade aguda, distúrbios gastrointestinais, injúria hepática, alopecia e nefropatia (Tacar *et al.*, 2013).

3.2.2 Atividade antitumoral

A fim de avaliar a atividade *in vivo* do óleo de chia com elevado teor de ω 3-PUFA, em um modelo tumoral, utilizou-se o modelo de tumor sólido de Ehrlich inoculado no tecido subcutâneo do flanco dos animais. Este tumor é de crescimento rápido, e o fato de ser inoculado no flanco do animal permite analisar o comportamento sistêmico do pré-tratamento de 35 dias e tratamentos de 21 dias com as dietas contendo diferentes teores de ω 3-PUFA, ω 6-PUFA e PUFA.

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia maligna indiferenciada derivada de carcinoma da mama em camundongos, com alta capacidade transplantável e taxa proliferativa rápida, sendo que o mesmo apresenta muitas semelhanças com tumores humanos e sensíveis à quimioterapia (Ehrlich, 1906; Gherman *et al.*, 2012; Bahr *et al.*, 2015).

Vários estudos relataram o uso benéfico do carcinoma ascítico de Ehrlich em modelos de tumores sólidos como uma ferramenta valiosa na exploração de atividades biológicas no câncer e principalmente de avaliar os efeitos potenciais de medicamentos, extrato de plantas, óleos vegetais e outros compostos químicos (Espada, *et al.*, 2007; Vendramini-Costa *et al.*, 2010; Kabel *et al.*, 2013; Iwamoto *et al.*, 2015; Bahr *et al.* 2015).

A **Figura 4** apresenta a massa relativa tumoral (%), massa do tumor, área de necrose e área tumoral dos grupos experimentais. Neste modelo experimental, os grupos que consumiram dieta com óleo de chia, DO5 ($0,25 \pm 0,11$ %), DO6 ($0,24 \pm 0,06$ %) e DO7 ($0,32 \pm 0,10$ %), apresentaram redução significativa no desenvolvimento tumoral, apresentando tumores com menor peso relativo (**Figura 4-A**), assim como o grupo DCDX tratado com o quimioterápico DOX ($0,24 \pm 0,06$ %). Em relação ao grupo DC ($0,60 \pm 0,16$ %), a porcentagem de redução da massa relativa tumoral foi de 60,00 %, 58,33 %, 60,00 % e 46,67 % para DCDX, DO5, DO6 e DO7, respectivamente.

A atividade antiproliferativa do quimioterápico doxorubicina em relação ao grupo DC ocorreu de forma eficaz. A DOX atua sobre os ácidos nucleicos das células em divisão por dois mecanismos principais; primeiramente pela intercalação entre os pares de bases das cadeias de DNA, inibindo assim a síntese de DNA e RNA em células de crescimento rápido, bloqueando a replicação e transcrição dos processos; e segundo na geração de radicais livres mediados pelo ferro, causando danos oxidativos as membranas celulares, proteínas e DNA (Thorn *et al.*, 2011; Cagel *et al.*, 2017). Isso ocorre porque a estrutura de quinona da DOX participa de reações redox como um aceitador de elétrons, sendo transformado em um radical livre de semiquinona por várias enzimas, tais como NADH desidrogenase mitocondrial, NADPH desidrogenase citosólico, xantina oxidase, e óxido nítrico-sintase endotelial (Thorn *et al.*, 2011; La Ferla *et al.*, 2011; Cagel *et al.*, 2017).

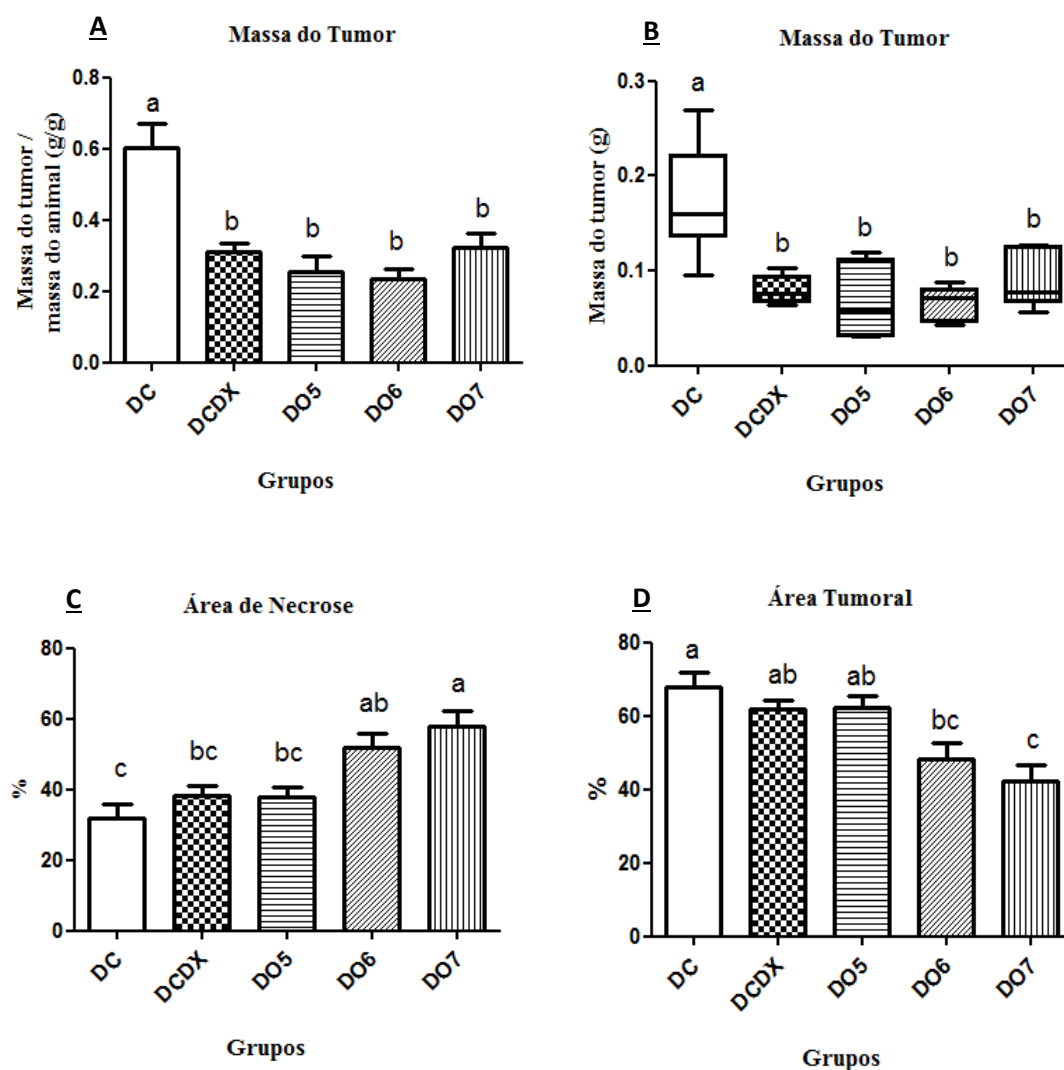


Figura 4. Atividade antitumoral dos diferentes grupos em modelo de tumor sólido de Ehrlich. DC: controle; DCDX: Doxo (3mg/kg, i.p.); DO7, DO6 e DO5: dieta contendo 5 %, 6 % e 7 % de óleo de chia. Tumor: (A) Massa relativa tumoral; (B) Massa tumoral (g); (C) Área de necrose (%) e (D) Área tumoral (%). Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. One way ANOVA, seguido de teste de Tukey para comparação dos diferentes grupos ($p < 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos pela análise do gráfico de caixa (**Figura 4-B**), a redução da massa do tumor nos grupos DO5 ($0,067 \pm 0,04$), DO6 ($0,066 \pm 0,01$) e DO7 ($0,089 \pm 0,03$) foi similar ao grupo DCDX ($0,079 \pm 0,01$), não havendo diferença estatística entre os mesmos. Portanto, neste modelo experimental de tumor sólido de Ehrlich, o consumo de óleo de chia reduziu o crescimento tumoral, isso provavelmente devido ao elevado teor de ω 3-PUFA e baixa proporção (ω -6/ ω -3)-PUFA, conforme apresentado na **Tabela 1**. Estudos têm concluído que o consumo

elevado de ω 3-PUFA tem reduzido o crescimento tumoral e os processos inflamatórios (Espada *et al.* 2007; Wang *et al.*, 2014). Além disso, os animais foram pré-tratados com as dietas contendo óleo de chia, indicando que o consumo regular de óleo de chia pode prevenir o crescimento tumoral.

Espada *et al.* (2007) investigaram o efeito antitumoral das dietas contendo 6 % de óleo de chia (razão (ω -6/ ω -3)-PUFA de 0,33) e 6 % óleo de cártamo (razão (ω -6/ ω -3)-PUFA de 315,83), consumidas no período de 45 dias, em um modelo de adenocarcinoma mamário murino transplantando subcutaneamente em camundongos Balb/C, obtendo redução significativa de 29,68 % na massa tumoral e 88,89 % no número de metástases no grupo que consumiram a dieta com óleo de chia, porém a dieta com óleo de cártamo não reduziu significativamente a massa tumoral em relação ao grupo controle.

Estudos têm demonstrado que a sinalização lipídica é desregulada nos tecidos tumorais, levando ao aumento da produção de eicosanóides pró-inflamatórios e pró-tumorigênicos a partir do ácido araquidônico (ARA) no microambiente tumoral (Larsson *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2014). O ARA (20:4 ω -6) é um ω 6-PUFA metabolicamente derivado do ácido linoléico (LA), sendo substrato para duas classes de enzimas: as prostaglandinas sintases (PG), que produzem os prostanoídes, prostaciclina e tromboxanos, pela ação primária da enzima ciclooxigenase (COX); e as lipoxigenases (LOX), que catalisam a biossíntese dos ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETE) e leucotrienos (Rose & Connolly, 1999).

A PG sintase catalisa reações sequenciais, sendo que na primeira etapa, a enzima ciclooxigenase (COX) converte ARA em prostaglandina- G_2 (PGG₂), e então a atividade enzimática da peroxidase reduz PGG₂ a prostaglandina- H_2 (PGH₂), e assim PGH₂ é convertida em prostaglandina- E_2 (Oates *et al.*, 1988; Rose & Connolly, 1999; Larsson *et al.*, 2004). Portanto, a via COX-2 desempenha um papel crítico na angiogênese, inflamação e câncer, pois um dos metabólitos da COX-2, a prostaglandina- E_2 (PGE₂), é amplamente conhecida por promover inflamação, neovascularização, crescimento de tumor primário e metástases; e o aumento da expressão de COX-2 tem sido observado em muitos tecidos tumorais (Wang & Dubois, 2010; Wang *et al.*, 2014).

A PGE₂ pode promover a sobrevivência de células tumorais, pois PGE₂ é encontrada em concentrações mais elevadas nessas células do que em células normais (Chulada *et al.*, 2000; Álvarez & Casellas, 2011). Os mecanismos pelos quais a PGE₂ pode promover a sobrevivência do tumor, incluem a inibição de apoptose e a

estimulação da proliferação celular (Cheuk *et al.*, 2002; Tsutsumi *et al.*, 2002; Álvarez & Casellas, 2011).

Estudos relatam que os ω 3-PUFA podem diminuir o risco de câncer através do seu efeito supressor sobre a biossíntese de eicosanóides derivados de ARA, e as altas ingestões de ω 3-PUFA resultam na sua incorporação como fosfolipídios nas membranas celulares, onde substituem parcialmente ARA (Crawford *et al.*, 2000; Larsson, *et al.*, 2004). Os ω 3-PUFA competem com os ω 6-PUFA por dessaturases e elongases, pois os ω 3-PUFA possuem afinidades maiores com essas enzimas do que os ω 6-PUFA, portanto, uma maior ingestão de ω 3-PUFA reduz a dessaturação e alongamento de LA para ARA, e conseqüentemente, reduz a produção dos derivados de ARA-eicosanóides (Rose & Connolly, 1999; Colussi *et al.*, 2017).

Assim, quando as fontes de ácidos graxos são ω 3-PUFA, a via COX produz lipoxinas, protectinas e resolvinas, as quais estão diretamente envolvidas na resolução dos processos inflamatórios com efeitos opostos aos da PGE₂, portanto o elevado consumo de ω 3-PUFA pode contribuir para redução dos processos inflamatórios crônicos envolvidos no desenvolvimento de muitos tumores (Greene *et al.*, 2011; Vendramini-Costa & Carvalho, 2012). Além disso, os ω 3-PUFA suprimem a COX-2 (Singh *et al.*, 1997; Hamid *et al.*, 1999; Larsson, *et al.*, 2004) e competem com ω 6-PUFA pelas ciclooxygenases para formar eicosanóides (Culp *et al.*, 1979; Corey *et al.*, 1983; Larsson, *et al.*, 2004).

O ácido alfa-linolênico (18:3- ω 3) é um ω 3-PUFA que fornece substrato para a conversão enzimática para eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), pois comparado com ARA, o EPA é o substrato preferencial para a lipoxigenase; portanto, um maior consumo de ω 3-PUFA leva a uma formação mais elevada dos produtos das enzimas lipoxigenases (Grimm *et al.*, 2002; Larsson, *et al.*, 2004).

O metabolismo dos PUFA pelas enzimas lipoxigenases (LOX) levam à formação de leucotrienos e hidroxi-ácidos graxos, porém existem várias isoformas das enzimas LOX (Funk, 2001; Wang *et al.*, 2014). Em geral, estudos têm relatado que a 5-LOX, 12-LOX e os seus metabólitos (5-HETE e 12-HETE) promovem câncer, enquanto a 15-LOX-1 e a 15-LOX-2 têm efeitos anti-tumor (Wang *et al.*, 2010; IL Lee *et al.*, 2011; Cathcart *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014). Além disso, o 5-HETE e 12-HETE demonstraram induzir angiogênese, inflamação e progressão tumoral (Pidgeon, *et al.*, 2002; Larsson, *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2014). Ambos, COX-2 e 5-LOX, são aumentados nos tecidos tumorais, e a inibição dos mesmos tem causado efeito

antitumoral (Martel-Pelletier *et al.*, 2003).

Por outra via de reação da lipoxigenases, EPA e DHA são os substratos de 15-LOX, que os transformam em ácido 15-hidroxi-eicosapentaenóico (15-HEPE) e ácido 17-hidroxi-docosahexaenóico (17-HDHA), respectivamente (Kim *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2014). Ambos, 15-HEPE e 17-HDHA, têm inibido a atividade enzimática de 5-LOX, sugerindo seus potenciais efeitos anti-inflamatórios (Ziboh *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2014). Além disso, 15-HEPE suprime a proliferação celular e induz a apoptose (Tang *et al.*, 2002; Larsson, *et al.*, 2004).

A resistência ao processo de morte celular é uma característica das células tumorais e está diretamente relacionada à tumorigênese (Hanahan e Weinberg, 2011). Agentes que diminuem a progressão tumoral, seja inibindo a multiplicação das células tumorais ou causando morte celular são considerados efetivos no tratamento e contensão do tumor.

Neste estudo avaliou-se áreas de necrose no tecido tumoral através de análise histológica, uma indicação do efeito antitumoral dos tratamentos. Morfológicamente a morte celular necrótica refere-se à um ganho no volume celular, inchaço das organelas, ruptura da membrana plasmática e perda subsequente de conteúdo intracelular, sendo em geral, uma consequência da condição fisiopatológica, como infecção, inflamação ou isquemia (Kerr *et al.*, 1972; Okada & Mak, 2004; Chaabane *et al.*, 2013).

A **Figura 4-C** e **Figura 4-D** apresentam a quantificação (%) das áreas de necrose e áreas tumorais dos cortes transversais do tumor sólido de Ehrlich dos grupos experimentais. As imagens histopatológicas dos tumores são demonstradas na **Figura 5**.

No aspecto histológico, a implantação subcutânea do tumor sólido de Ehrlich resultou em uma massa tumoral envolvida por uma pseudocápsula, constituída por células pleomórficas com citoplasma abundante e células gigantes multinucleadas, com uma área central de necrose rodeada por células tumorais viáveis. Os grupos DCDX, DO5, DO6 e DO7 apresentaram extensas regiões de necrose, ocorrendo maior área de necrose na região central, porém o grupo DC apresentou pequenas áreas de necrose (**Figura 5**). Histologicamente, os tumores dos grupos DO7 e DO6 apresentaram-se semelhantes, não havendo diferença significativa quanto a área de necrose e massa relativa tumoral (**Figura 4**).

De acordo com **Figura 4-C**, as áreas de necrose dos grupos DCDX ($38,30 \pm 5,77 \%$), DO5 ($37,70 \pm 6,65 \%$) e DO6 ($51,81 \pm 9,34 \%$) não exibiram diferença

significativa entre si. Do mesmo modo, não houve diferença significativa entre o grupo DO6 com o grupo DO7 ($57,84 \pm 9,79 \%$), embora o grupo DO7 tenha aumentado em $11,63 \%$ a área de necrose. Além disso, o grupo DO7 apresentou significativamente maior $\%$ de necrose em comparação com DC ($31,98 \pm 8,29 \%$) e DCDX, com aumento de $80,86 \%$ e $51,01\%$, respectivamente. De acordo com os resultados obtidos, o aumento das áreas de necrose nos grupos DO6 e DO7 sugere-se estar relacionado com a ação antiangiogênica dos $\omega 3$ -PUFA presentes nas dietas consumidas. Os $\omega 3$ -PUFA suprimem a COX-2, enzima que participa na angiogênese em um estágio essencial no desenvolvimento e invasão do tumor, e inibem a ação do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) nas células tumorais.

A enzima COX-2 catalisa a geração de prostaglandinas, consequentemente os níveis de VEGF e do fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) que são aumentados em resposta as prostaglandinas, tais como PGE_2 , mostrando a atividade dos prostanóides na angiogênese, pois os efeitos dos prostanóides produzidos pela COX-2 são provavelmente amplificados pela ação do VEGF, que estimula a liberação da enzima fosfolipase- A_2 e a expressão de COX-2, aumentando assim a produção de PGE_2 nas células tumorais (Iñiguez *et al.*, 2003; Vendramini-Costa & Carvalho, 2012).

Zhang *et al.* (2013) reportaram que $\omega 3$ -PUFA reduzem os riscos de câncer através dos mecanismos antiangiogênicos, demonstrando que os ácidos epoxidocosapentaenóicos (EDPs), os quais são mediadores lipídicos produzidos pelas epoxigenases do citocromo P450 a partir do ácido docosahexaenóico (DHA), inibiram VEGF e a angiogênese induzida pelo bFGF em ensaios tumorais em camundongos.

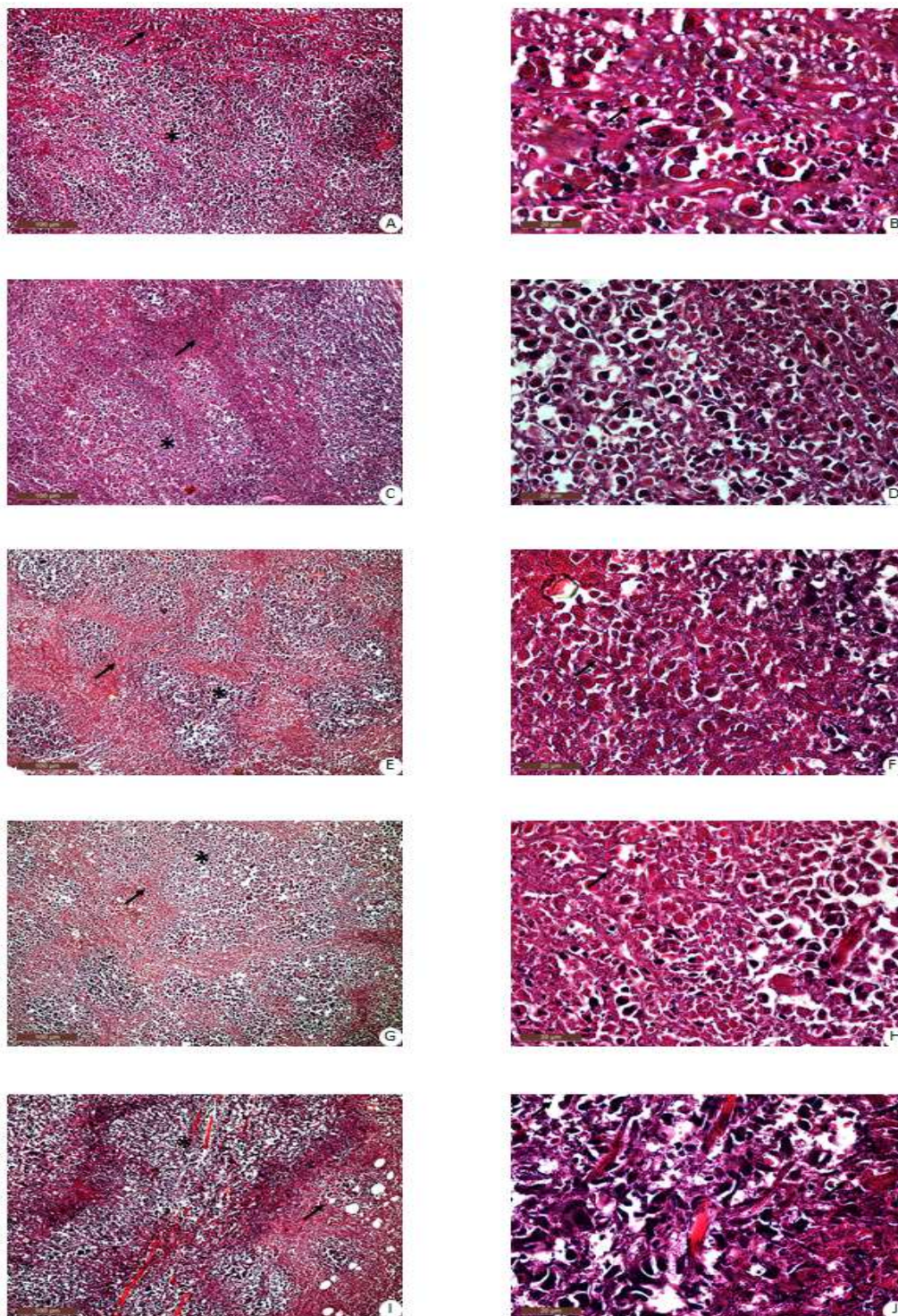


Figura 5. Análise histopatológica do tumor sólido de Ehrlich experimental. Em (A) e (B) nota-se a presença de áreas de necrose (seta) e área tumoral (asterisco) do grupo controle (HE 100x e 500x). Em (C) e (D) nota-se o aumento da área necrosada (seta) em relação à área tumoral (asterisco) no grupo tratado com doxorubicina (HE, 100x e 500x). Em (E) e (F) nota-se um aumento das áreas necrosadas (seta) e redução da área tumoral (asterisco) no grupo tratado com óleo de chia 7 %, quando comparado ao grupo controle (HE, 100x e 500x). Em (G) e (H) é mostrado o resultado de tratamento com óleo de chia 6%. Nota-se um aumento das áreas necrosadas (setas) e redução da área tumoral (asterisco), quando comparado ao grupo controle (HE, 100x e 500x). Não foi observado diferença estatística significativa entre o grupo tratado com óleo de chia 7 % e óleo de chia 6 %. Em (I) e (J) é apresentado o resultado de tratamento com óleo de chia 5 %, notou-se aumento da área necrosada (seta) e redução da área tumoral (asterisco), no entanto observou-se diferença significativa quando comparado ao grupo tratado com óleo de chia 7 %.

3.2.3 Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Os parâmetros hematológicos fornecem o perfil dos elementos celulares do sangue, demonstrando os valores quantitativos dos leucócitos totais (WBC), eritrócitos (RBC) e plaquetas (PLT), bem como a concentração de hemoglobina (HGB) e a porcentagem de hematócritos (% hemácias no sangue). A **Tabela 3** apresenta os parâmetros hematológicos dos grupos experimentais. Para fins de referência, os parâmetros hematológicos dos camundongos Balb/C sadios (sem tumores), da mesma idade e recebendo a dieta controle, foram inseridos na **Tabela 3** como DC sadio.

Tabela 3. Parâmetros hematológicos dos grupos experimentais.

Parâmetros hematológicos	DC sadio	DC	DCDX	DO5	DO6	DO7
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	$3,45 \pm 1,11^b$	$7,30 \pm 1,41^a$	$2,86 \pm 1,22^b$	$6,56 \pm 2,70^a$	$7,36 \pm 1,44^a$	$3,26 \pm 0,57^b$
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	$10,13 \pm 0,71^b$	$11,19 \pm 0,51^a$	$8,73 \pm 0,55^c$	$10,74 \pm 0,35^{ab}$	$10,53 \pm 0,40^{ab}$	$11,40 \pm 0,44^a$
HGB (g/dL)	$14,10 \pm 0,89^b$	$15,57 \pm 0,55^a$	$12,35 \pm 0,86^c$	$14,90 \pm 0,57^{ab}$	$14,62 \pm 0,65^{ab}$	$15,60 \pm 0,32^a$
HCT (%)	$48,82 \pm 3,18^b$	$56,92 \pm 1,93^a$	$45,02 \pm 2,94^b$	$55,92 \pm 2,11^a$	$53,93 \pm 2,47^a$	$56,82 \pm 1,49^a$
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	$1386 \pm 76,6^{bc}$	$1311 \pm 197,6^{bc}$	$1722 \pm 196,9^a$	$1198 \pm 162,1^b$	$1109 \pm 95,6^b$	$1499 \pm 200,7^c$

Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Observar-se que houve aumento da quantidade de leucócitos totais (leucocitose) nos animais com tumores em relação aos animais sadios (DC sadio), o que pode ser indício de recrutamento de células do sistema imune (principalmente células mielóides) para órgãos periféricos, processo comum ao desenvolvimento tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011; Deronic *et al.*, 2016). Tumores experimentais, como o tumor de Ehrlich, produzem mudanças severas no sistema hematopoético do hospedeiro, sendo frequentemente associadas com imunodepressão e leucocitose granulócito-dependente (Bincoletto *et al.*, 2005), conforme observado nos grupos DC, DO5 e DO6.

Como esperado, o tratamento com doxorrubicina limita a expansão de leucócitos (diminuição de 60,82 % em comparação ao grupo DC), acompanhada de redução da concentração de hemoglobina e quantidade de eritrócitos (RBC) no sangue (**Tabela 3**). A diminuição dos parâmetros hematológicos no grupo DCDX ocorreram devido ao efeito antitumoral da doxorrubicina, limitando assim o recrutamento de

células provenientes da medula óssea, e aos seus efeitos hematotóxicos, sendo a hipoplasia sanguínea um dos seus principais efeitos colaterais (Richardson & Johnson, 1997). Estudos com modelo experimentais de câncer de mama em camundongos têm relatado redução significativa nos valores de leucócitos totais (37,61 %) em consequência do tratamento com doxorubicina (Cabeza *et al.*, 2017), de acordo com os dados obtidos no grupo DCDX.

Não houve diferença significativa nos valores obtidos de leucócitos totais nos grupos DC sadio, DCDX e DO7, porém os grupos DC, DO5 e DO6 apresentaram aumento significativo da quantidade de leucócitos totais em comparação com DC sadio devido às mudanças severas no sistema hematopoético dos animais. Entretanto o grupo DO7 não exibiu alterações no sistema hematopoético em comparação com os grupos DO5 e DO6 (**Tabela 3**).

Os grupos DO5 e DO6 não apresentaram diferença estatística comparado com os grupos DC e DC sadio para os valores de RBC e HGB. Porém, o grupo DO7 exibiu significativamente maiores valores para RBC e HGB em relação ao grupo DC sadio, entretanto não houve diferença com o grupo DC.

Houve diferença significativa nos valores obtidos de hematócritos nos grupos DC sadio ($48,82 \pm 3,18$ %) e DCDX ($56,92 \pm 1,93$ %). Os grupos DO5, DO6, DO7 e DC apresentaram aumento significativo nos valores de HCT em relação ao grupo DC sadio, devido às alterações no sistema hematopoético causadas pelo tumor sólido de Ehrlich. Os grupos DO5, DO6 e DO7 não foram estatisticamente diferentes do grupo DC.

Os grupos experimentais, DO5 ($1198 \pm 162,1 \times 10^3/\mu\text{L}$), DO6 ($1109 \pm 95,6 \times 10^3/\mu\text{L}$) e DO7 ($1499 \pm 200,7 \times 10^3/\mu\text{L}$) não exibiram diferença significativa para valores de plaquetas comparado com o grupo DC ($1311 \pm 197,6 \times 10^3/\mu\text{L}$) e DC sadio ($1386 \pm 76,6 \times 10^3/\mu\text{L}$). Porém, o grupo DCDX ($1722 \pm 196,9 \times 10^3/\mu\text{L}$) obteve aumento nas quantidades de plaquetas no sangue (31,35 %) em comparação com o grupo DC. As plaquetas ajudam a mediar a coagulação do sangue, que é uma malha de fibras de fibrina, sendo que essas fibras aderem a qualquer abertura vascular, desempenhando um papel crucial na redução da perda de sangue e reparação de lesão vascular (Oyedemi *et al.*, 2011).

O aumento de plaquetas no grupo DCDX relata possíveis reparos no sistema vascular nos animais devido à administração da doxorubicina (DOX). Cabeza *et al.*

(2017) obtiveram aumento nos valores de plaquetas e redução nos valores de WBC em camundongos tratados com doxorubicina em modelo experimental de câncer de mama.

As análises bioquímicas são parâmetros de importante avaliação para determinação dos possíveis efeitos adversos nos tecidos vitais dos animais, efeitos esses resultantes do desenvolvimento da doença ou colaterais ao tratamento. A gama glutamil transferase (GGT) é uma enzima responsável pelo catabolismo extracelular da glutatona, podendo ser produzida por diferentes tecidos, porém a maior parte da GGT presente no soro provém do fígado (Emdin *et al.*, 2005). TGO, TGP e ALP são enzimas biomarcadoras de lesões hepáticas, portanto elevados índices dessas enzimas indicam danos no fígado (Subramani *et al.*, 2014).

A atividade enzimática TGP (alanina aminotransferase) no soro sanguíneo é utilizada especificamente para avaliar necrose hepática e doenças hepatocelulares nos animais em ensaios laboratoriais, enquanto a atividade enzimática TGO (aspartato aminotransferase) é específica para avaliar infarto do miocárdio e doenças hepáticas (Loeb & Quimby, 1999). A **Tabela 4** apresenta os parâmetros bioquímicos dos grupos experimentais.

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos dos grupos experimentais.

Parâmetros	DC sadio	DC	DCDX	DO5	DO6	DO7
TGP (U/L)	54,90 ± 15,46 ^a	70,68 ± 32,46 ^a	89,12 ± 42,99 ^a	86,04 ± 39,41 ^a	72,18 ± 21,15 ^a	57,72 ± 23,74 ^a
TGO (U/L)	375,80 ± 42,17 ^{ab}	388,50 ± 72,11 ^{ab}	511,33 ± 61,26 ^a	501,67 ± 114,85 ^a	439,33 ± 73,26 ^a	301,01 ± 45,64 ^b
ALP (U/L)	72,80 ± 16,48 ^a	110,80 ± 4,54 ^a	66,48 ± 10,32 ^b	112,68 ± 47,55 ^a	114,80 ± 10,28 ^a	101,54 ± 3,44 ^a
GGT (U/L)	<5,0 ± 0,0 ^a	<5,0 ± 0,0 ^a	<5,0 ± 0,0 ^a	<5,0 ± 0,0 ^a	<5,0 ± 0,0 ^a	<5,0 ± 0,0 ^a

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão.

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa (p<0,05) pelo teste de Tukey.

As enzimas TGP e GGT não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais. Entretanto, o grupo DO7 demonstrou redução de 18,34 % para TGP em relação ao grupo DC e valores similares ao grupo DC sadio. O grupo DCDX, DO5, DO6 e DC não exibiram diferença estatística quanto aos resultados de TGO em relação ao grupo DC sadio e DC. O grupo DO7 não apresentou diferença significativa em relação aos grupos DC e DC sadio para TGO, porém foi estatisticamente diferente dos grupos DO5, DO6 e DCDX, o mesmo obteve redução significativa de 37,89 % em comparação com os grupos DCDX, DO5 e DO6 (**Tabela 4**). Portanto, o grupo que

consumiu dieta com 7 % de óleo de chia (DO7) não reportou alterações nos parâmetros de TGP e TGO, exibindo assim menores alterações hepáticas.

A ALP é uma enzima hidrolítica intracelular que age sobre os fosfoglicerídios ou ésteres fosfóricos, completando sua degradação com a liberação de fosfato, portanto alterações na atividade da fosfatase alcalina do soro sanguíneo indicam incapacidade de excreção biliar ou lesões das células hepáticas (Sherlock, 1985; Jong, 1996). Não houve diferença significativa para ALP entre os grupos experimentais DC, DO5, DO6 e DO7, porém o grupo DCDX apresentou diferença significativa, indicando possíveis lesões hepáticas (**Tabela 4**).

3.2.4 Análise macroscópica dos tecidos

O fármaco DOX tem uma ação terapêutica relativamente baixa, apesar de sua notável atividade antitumoral, sendo a sua aplicação clínica limitada, devido às toxicidades agudas e crônicas, tais como mielossupressão, imunossupressão, resistência à fármacos e efeitos secundários tóxicos aos tecidos não tumorais, tais como coração, fígado e rins (Chen *et al.*, 2005; Elsherbiny *et al.*, 2016).

A massa relativa do coração, pulmão e rins não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais (**Tabela 5**). Entretanto, houve diferença significativa na massa relativa do baço no grupo DC ($0,65 \pm 0,06$) em comparação com os demais grupos experimentais. A massa relativa do baço no grupo DCDX ($0,43 \pm 0,07$) apresentou redução de 33,85 % em comparação com o grupo DC.

Tabela 5. Massa relativa dos tecidos (massa tecido (g)/massa do animal (g)).

Tecidos	DC	DCDX	DO5	DO6	DO7
Baço	$0,65 \pm 0,06^a$	$0,43 \pm 0,07^b$	$0,58 \pm 0,09^b$	$0,53 \pm 0,03^b$	$0,50 \pm 0,05^b$
Coração	$0,56 \pm 0,07^a$	$0,57 \pm 0,07^a$	$0,59 \pm 0,07^a$	$0,54 \pm 0,07^a$	$0,53 \pm 0,07^a$
Fígado	$4,23 \pm 0,19^b$	$4,10 \pm 0,32^b$	$4,68 \pm 0,17^a$	$4,17 \pm 0,32^b$	$4,12 \pm 0,14^b$
Pulmão	$0,67 \pm 0,07^a$	$0,65 \pm 0,06^a$	$0,62 \pm 0,12^a$	$0,61 \pm 0,08^a$	$0,66 \pm 0,06^a$
Rins	$1,47 \pm 0,05^a$	$1,40 \pm 0,05^a$	$1,50 \pm 0,13^a$	$1,47 \pm 0,12^a$	$1,45 \pm 0,09^a$

Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Korekane *et al.* (2003) e Verçosa Júnior *et al.* (2006) também relataram aumento da massa relativa do baço nos animais inoculados com tumor de Ehrlich, e atribuíram este aumento à uma maior atividade hemocaterética. A função

hemocaterética é a atuação do baço na metabolização das células sanguíneas, tendo como principais elementos os RBC e a HGB (Jamra, 1941). Além disso, aumento do baço está relacionado com o recrutamento e acúmulo de células do sistema imune para este órgão, uma característica do desenvolvimento tumoral. Dessa forma, o baço funciona como um reservatório de células mielóides e linfócitos que podem ser recrutados para o tecido tumoral (Bronte & Pittet, 2013; Talmadge & Gabrilovich, 2013; Deronic *et al.*, 2016).

A massa relativa do fígado (**Tabela 5**) dos grupos experimentais DC ($4,23 \pm 0,19$), DCDX ($4,10 \pm 0,32$), DO6 ($4,17 \pm 0,32$) e DO7 ($4,12 \pm 0,14$) foi significativamente menor do que o grupo DO5 ($4,68 \pm 0,17$), demonstrando que os grupos DC, DCDX, DO6 e DO7 apresentaram possivelmente maior atividade de gliconeogênese hepática, a qual pode ser correlacionada com a massa corporal final dos grupos experimentais (**Figura 3**), pois observa-se que o grupo DO5 apresentou maior média corporal final ($29,97 \pm 2,43$ g) do que os demais grupos experimentais.

O tumor de Ehrlich produz alterações nos processos metabólicos do fígado devido ao aumento na atividade da isoenzima piruvato quinase (PK) e das enzimas tirosina aminotransferase (TAT) e serina desidratase (SDH) (Korekane *et al.*, 2003). A PK é uma enzima da via glicolítica, sendo marcadora da diferenciação das células hepáticas, enquanto SDH e TAT são importantes enzimas no metabolismo dos aminoácidos e gliconeogênese no fígado (Pitot, *et al.*, 1972; Imamura *et al.*, 1986; Korekane *et al.*; 2003).

A estimulação da gliconeogênese hepática pode ser responsável pela redução de massa corporal nos hospedeiros portadores de tumores, do mesmo modo, algumas citocinas estimuladas pelo tumor podem contribuir para a neoglicogênese. Korekane *et al.* (2003) reportaram redução na massa corporal e massa relativa do fígado nos animais após setes dias de inoculação (2×10^7 células/animal) do tumor de Ehrlich.

Nos mamíferos, o excesso de nutrientes energéticos é armazenado principalmente como triglicérides, que são mobilizados quando ocorre demanda de energia, pois os hormônios detectam as condições fisiológicas e consequentemente coordenam o metabolismo energético nos tecidos (Nakamura *et al.*, 2014; Saavedra-García *et al.*, 2017). Entretanto, o tipo e a quantidade de lipídeos ingerida em uma dieta é quem regula a composição lipídica hepática e a expressão gênica hepática (Jump *et al.*, 2005; Jump, 2008). Os lipídeos são macromoléculas importantes responsáveis pela

estrutura da membrana e pelo fornecimento de energia, e incluem ácidos graxos, fosfolípidos, colesterol e triglicérides neutros (Chen & Li, 2016).

Os teores de lipídeos totais hepáticos dos camundongos foram determinados e apresentados na **Figura 6**. Os grupos, DC ($11,40 \pm 1,05$ g/100 g) e DCDX ($10,11 \pm 1,37$ g/100 g), que ingeriram dieta contendo 7 % de óleo de soja (DC), não apresentaram diferença significativa entre si quanto ao teor de lipídeos totais, demonstrando assim, que a doxorrubicina não alterou o teor de lipídeos totais no fígado dos animais do grupo DCDX. Porém, o teor de lipídeos totais no fígado dos camundongos do grupo DO7 ($8,02 \pm 1,05$ g/100 g), que consumiram 7 % de óleo de chia, foram significativamente menor (29,65 %) comparado com o grupo DC. Do mesmo modo, os grupos DO5 ($14,52 \pm 2,02$ g/100 g), DO6 ($12,56 \pm 2,42$ g/100 g) e DO7 ($8,02 \pm 1,05$ g/100 g) exibiram diferença significativa entre si quanto ao teor de lipídeos totais no fígado, sendo que grupo DO7 reportou menor teor de lipídeos em comparação com os grupos DO5 e DO6, devido ao seu maior perfil de PUFA na dieta (76,89 %), conforme demonstrado na **Tabela 1**.

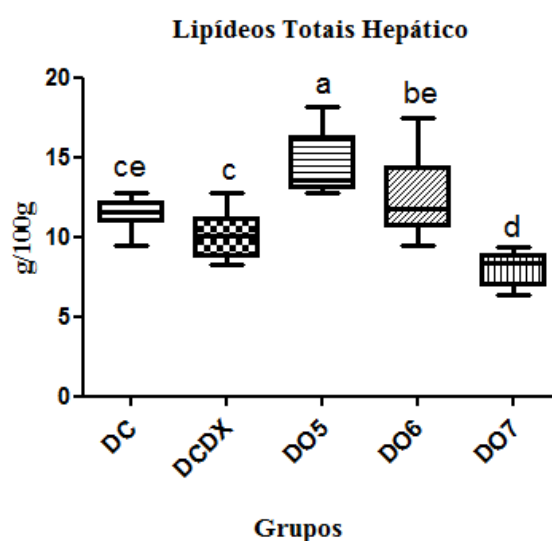


Figura 6. Lipídeos totais hepático dos animais dos diferentes grupos. DC: dieta controle; DCDX: doxorrubicina (3mg/kg, i.p.); DO5, DO6, DO7: dietas contendo 5 %, 6 % e 7% de óleo de chia. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. One way ANOVA, seguido de teste de Tukey para comparação dos diferentes grupos ($p < 0,05$).

No fígado dos roedores, os PUFA suprimem a expressão e a atividade da proteína de ligação do elemento de regulação dos esteróis-1c (SREBP-1c) e da proteína de ligação do elemento de resposta sensível aos carboidratos (ChREBP), fatores de

transcrição chave para indução da expressão de genes relacionados à lipogênese e lipogênese *de novo*. No entanto, este efeito é limitado aos PUFA, e não é observado para os ácidos graxos saturados e monoinsaturados, os quais são as principais fontes de energia (Nakamura *et al.*, 2014). Portanto, o consumo elevado de PUFA pode inibir a indução das enzimas pró-lipogênicas, diminuindo o teor de lipídeos hepático.

Estudos *in vivo* reportaram que a combinação de uma dieta com elevado teor de ω 3-PUFA e de ácidos graxos saturados (SFA) aumentou a concentração de ω 3-PUFA no plasma e no teor de lipídeos hepáticos, enquanto que uma dieta rica em SFA e deficiente em ω 3-PUFA aumentou o teor de lipídios sanguíneos, colesterol e triglicérides (Garg *et al.*, 1990; MacDonald-Wicks & Garg, 2004; Ruiz-Núñez *et al.*, 2016).

O colesterol é um componente crucial que mantém a fluidez e a permeabilidade da membrana celular nos vertebrados, sendo que o mesmo entra na circulação sanguínea de duas maneiras, através da absorção intestinal após digestão e na síntese *de novo* do colesterol que é realizada principalmente pelo fígado (Ikonen, 2008; Sozen & Ozer, 2017).

O colesterol livre pode ser armazenado no fígado, formando ésteres de colesterol ou reunidos em lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), juntamente com triglicérides e apolipoproteínas, seguido pela secreção para a circulação sanguínea. Durante a circulação sanguínea, a VLDL perde o seu conteúdo de triglicérides, pela lipoproteína lipase e lipase hepática, e é convertida em lipoproteína de densidade intermédia (IDL), seguida de lipoproteína de baixa densidade (LDL), conforme reportado por Hussain (2014) e Sozen & Ozer (2017).

Os níveis de colesterol total e triglicérides foram determinados no fígado dos camundongos com objetivo de avaliar diferença estatística entre as dietas com diferentes teores de SFA, PUFA e razão (ω 6/ ω 3)-PUFA em um modelo de tumor sólido de Ehrlich (**Figura 7**).

Os grupos DC ($224,30 \pm 15,10$ mg/100) e DCDX ($233,10 \pm 14,59$ mg/100), que consumiram dieta com 7 % de óleo de soja, não apresentaram diferença significativa entre si quanto aos níveis de triglicérides, porém exibiram diferença quanto aos níveis de colesterol total, sendo DC ($42,92 \pm 9,23$ mg/100) e DCDX ($59,68 \pm 5,42$ mg/100), respectivamente. Os níveis elevados de colesterol total no fígado dos animais no grupo DCDX podem estar possivelmente relacionado à toxicidade da DOX, que ao metabolizar a doxorrubicina no fígado, produz elevado número de espécies reativas de

oxigênio (ROS), e consequentemente as ROS causam uma quantidade excessiva de danos, que vão desde danos ao DNA, produção de peroxidação lipídica, diminuição dos níveis de vitamina E, redução da glutathiona reduzida (GSH) e processos oxidativos (Tacar *et al.*, 2012).

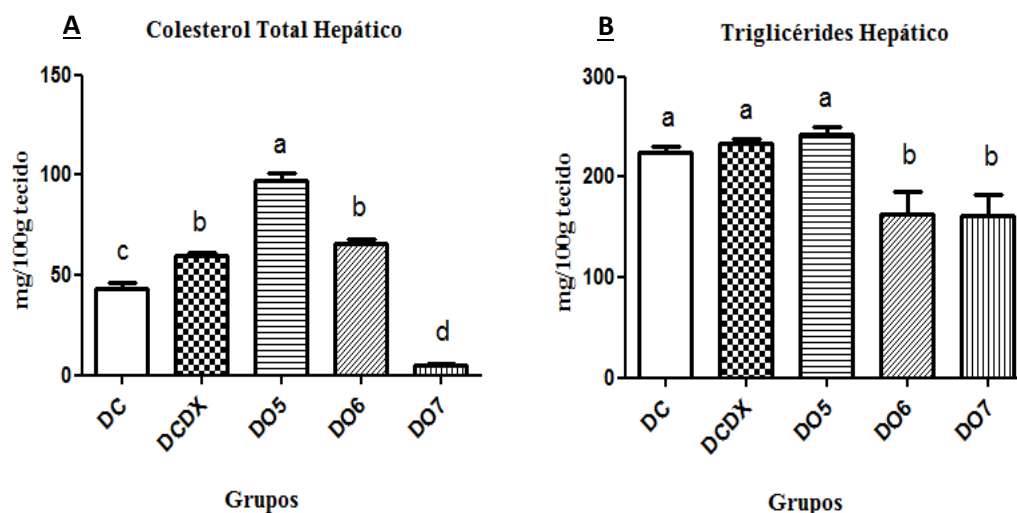


Figura 7. Colesterol total hepático (A) e Triglicérides hepático (B) dos animais dos diferentes grupos. DC: dieta controle; DCDX: doxorubicina (3mg/kg, i.p.); DO5, DO6, DO7: dietas contendo 5 %, 6 % e 7 % de óleo de chia. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. One way ANOVA, seguido de teste de Tukey para comparação dos diferentes grupos ($p < 0,05$).

Não houve diferença significativa quanto aos níveis de triglicérides do grupo DO5 ($243,10 \pm 16,97$ mg/100) em relação aos grupos DC e DCDX. Entretanto, o grupo DO5 apresentou significativamente maior nível de colesterol total ($96,88 \pm 12,50$ mg/100) em comparação com os demais grupos experimentais. Isso pode estar diretamente relacionado à maior média de massa corporal final, peso relativo do fígado e teor de lipídeos no fígado destes animais em comparação com os demais grupos (**Figura 6 e Figura 3**).

Os níveis de triglicérides dos grupos DO6 ($162,80 \pm 59,47$ mg/100) e DO7 ($161,80 \pm 54,59$ mg/100) não apresentaram diferença significativa entre si, entretanto o grupo DO5 ($243,10 \pm 16,97$ mg/100) apresentou significativamente maiores níveis de triglicérides em comparação com os grupos DO6 e DO7, devido provavelmente ao maior teor de lipídios no fígado (**Figura 6**).

Os níveis de colesterol total do grupo DO7 foram significativamente menor (87,72 %) em relação ao grupo DC, sendo que esta redução pode estar diretamente relacionada com o elevado conteúdo de ω 3-PUFA e baixo ratio (ω -6/ ω 3)-PUFA na dieta. Marineli *et al.* (2015) reportaram que dieta contendo 4 % de óleo de chia reduziu o estresse oxidativo *in vivo*, diminuindo a peroxidação lipídica em ratos obesos induzidos pela dieta. Ayerza & Coates (2005) demonstraram que dieta com 5 % de óleo de chia reduziu os níveis de triglicérides em ensaios *in vivo*.

Além disso, os grupos DO5 ($96,88 \pm 12,50$), DO6 ($65,48 \pm 6,50$) e DO7 ($5,27 \pm 1,74$) exibiram diferença significativa entre si quanto aos níveis de colesterol total, sendo que grupo DO7 obteve menores níveis em comparação com os grupos DO5 e DO6, possivelmente por apresentar menores teores de lipídeos totais no fígado (Figura 6).

4. CONCLUSÃO

O óleo da semente de chia possui um elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente o ácido α -linolênico, e baixa proporção de (ω 6/ ω 3)-PUFA. O consumo do óleo de chia na dieta diminuiu significativamente o crescimento da massa tumoral no modelo experimental de tumor sólido de Ehrlich utilizando camundongos machos Balb/C. De acordo com os resultados, os animais tratados com as dietas contendo 5 %, 6 % e 7 % de óleo de chia apresentaram menores tumores em comparação com o grupo controle, apresentando redução média de 55 % na massa tumoral, sendo a atividade antitumoral semelhante ao do quimioterápico doxorrubicina. Além da potente ação antitumoral, o consumo diário de dieta contendo óleo de chia não promoveu sinais de toxicidade, diferente do grupo tratado com doxorrubicina, que apresentou redução da massa corporal final e alterações nos parâmetros hematológicos.

De acordo com resultados obtidos, pode-se concluir que o consumo de óleo de chia na dieta, especialmente contendo 7 % de óleo de chia, possui potencial ação preventiva contra a formação de tumores, não apresentando efeitos colaterais. Um dos grandes desafios no controle do câncer é a busca por agentes preventivos, bem aceitos e de fácil acesso à população, desejavelmente sem efeitos colaterais. O óleo de chia certamente representa um potencial a ser explorado e estudos futuros serão realizados a fim de confirmar seu potencial preventivo em modelos crônicos de carcinogênese.

5. REFERÊNCIAS

- Álvarez, R. M. A., & Casellas, N. M. (2011). Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6 en el riesgo de cáncer de mama. *Rev Esp Nutr Hum Diet.*, 15(4), 189–193.
- AOAC. (2006). Official Methods of Analysis of AOAC International 18th. Gaithersburg. AOAC International.
- AOCS. (2009). Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. AOCS Press, Champaign, USA.
- Atwater, W. O., & Bryant, A. P. (1900). The availability and fuel value of food materials. Washington, DC: US Government Printing Office, Agriculture Experiment Station, 12th Annual Report, 73–110.
- AVMA. (2007). AVMA guidelines on euthanasia.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2005). Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. *Nutrition Research*, 25, 995–1003.
- Bahr, H. I., Toraih, E. A., Mohammed, E. A., Mohammadc, H. M. F., Ali, E. A. I., & Zaitone, S. A. (2015). Chemopreventive effect of leflunomide against Ehrlich's solid tumor grown in mice: effect on EGF and EGFR expression and tumor proliferation. *Life Sciences*, 141, 193–201.
- Bincoletto, C., Eberlin, S., Figueiredo, C. A. V., Luengo, M. B., & Queiroz, M. L. S. (2005). Effects produced by Royal Jelly on haematopoiesis: relation with host resistance against Ehrlich ascites tumour challenge. *International Immunopharmacology*, 5, 679–688.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *J Biochem Physiol*, 37(8), 911–917.
- BRASIL - ANVISA (2003). RDC 360 - Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*.
- Bronte, V. & Pittet, M. J. (2013). The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity* 39(5), 806–818.
- Cabeza, L., Ortiz, R., Prados, J., Delgado, A. V., Martín-Villena, M. J., Clares, B., Perazzoli, G., Entrena, J. M., Melguizo, C., & Arias, J. L. (2017). Improved antitumor activity and reduced toxicity of doxorubicin encapsulated in poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles in lung and breast cancer treatment: an in vitro and in vivo study. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102, 24–34.
- Cagel, M., Grotz, E., Bernabeu, E., Moretton, M. A., & Chiappetta, D. A. (2017). Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. *Drug Discovery Today*, 22(2), 270–281.
- Cathcart, M. C., Lysaght, J., & Pidgeon, G. P. (2011). Eicosanoid signalling pathways in the development and progression of colorectal cancer: novel approaches for prevention/intervention. *Cancer Metastasis Rev*, 30(3), 363–385.
- Chaabane, W., User, S. D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J., & Łos, M. J. (2013). Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 61, 43–58.
- Chen, J. H., Ling, R., Yao, Q., Li, Y., Chen, T., Wang, Z., & Li, K. Z. (2005). Effect of small-sized liposomal Adriamycin administered by various routes on a metastatic breast cancer model. *Endocr. Relat. Cancer*, 12, 93–100.
- Chen, Y., & Li, P. (2016). Fatty acid metabolism and cancer development. *Sci. Bull.*, 61(19), 1473–1479.

- Cheuk, B. L., Chew, S. B., Fiscus, R. R., & Wong, P. Y. (2002). Cyclooxygenase-2 regulates apoptosis in rat epididymis through prostaglandin D₂. *Biol Reprod.*, 66, 374–380.
- Chulada, P. C., Thompson, M. B., & Mahler, J. F. (2000). Genetic disruption of Ptgs 1, as well Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer Res.*, 60, 4705–4708.
- Colussi, G., Catena, C., Novello, M., Bertin, N., & Sechi, L. A. (2017). Impact of omega-3 polyunsaturated fatty acids on vascular function and blood pressure: relevance for cardiovascular outcomes. *Nutr., Metab. & Card. Diseases*, 27, 191–200.
- Corey EJ, Shih C, & JR., C. (1983). Docosahexaenoic acid is a strong inhibitor of prostaglandin but not leukotriene biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 3581–3584.
- Crawford, M., Galli, C., Visioli, F., Renaud, S., Simopoulos, A. P., & Spector, A. A. (2000). Role of plant-derived omega-3 fatty acids in human nutrition. *Ann. Nutr. Metab.*, 44, 263–265.
- Culp, B. R., Titus, B. G., & Lands, W. E. (1979). Inhibition of prostaglandin biosynthesis by eicosapentaenoic acid. *Prostaglandins Med*, 3, 269–278.
- De Silva, S., Francis, D. S., & Tacon, A. G. (2011). Fish oil in aquaculture: in retrospect. In *Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds*, 1–20.
- Deronic, A., Leanderson, T, Ivars, F. (2016). The anti-tumor effect of the quinoline-3-carboxamide tasquinimod : blockade of recruitment of CD11b⁺ Ly6C^{hi} cells to tumor tissue reduces tumor growth. *BMC Cancer*, 16:440, 1–15.
- Ehrlich, P. (1906). Experimentelle karzinom-studien an mäuse. *Arch. Insect. Exp. Ther.* 1, 65.
- Elsherbiny, N. M., Younis, N. N., Shaheen, M. A., & Elseweidy, M. M. (2016). The synergistic effect between vanillin and doxorubicin in ehrlich ascites carcinoma solid tumor and MCF-7 human breast cancer cell line. *Pathology – Research and Practice*, 212, 767–777.
- Emdin, M., Pompella, A., & Paolicchi, A. (2005). Gamma-glutamyltransferase, atherosclerosis, and cardiovascular disease: triggering oxidative stress within the plaque. *Circulation*, 112, 2078–2080.
- Erdi Sozen, E., & Ozer, N. K. (2017). Impact of high cholesterol and endoplasmic reticulum stress on metabolic diseases: an updated mini-review. *Redox Biology*, 12, 456–461.
- Espada, C. E., Berra, M. A., Martinez, M. J., Eynard, A. R., & Pasqualini, M. E. (2007). Effect of chia oil (*Salvia Hispanica*) rich in ω-3 fatty acids on the eicosanoid release, apoptosis and T-lymphocyte tumor infiltration in a murine mammary gland adenocarcinoma. *Prostaglandins, Leuk and Essential Fatty Acids*, 77, 21–28.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G. H. A. (1957). A simple methods for the insolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497–507.
- Funk, C. D. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 294(5548), 1871–1875.
- Garg, M. L., Thomson, A. B., & Clandinin, M. T. (1990). Interactions of saturated, n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids to modulate arachidonic acid metabolism. *J. Lipid Res.*, 31, 271–277.

- Gherman, C., Pileczki, V., Petric, R. C., Braicu, C., Răpuntean, S., & Neagoe, I. B. (2012). In vitro studies for evaluation the antitumoral and immunomodulator effect of EGCG on Ehrlich ascites. *Arch. Zootech.*, 5(2), 79–87.
- Gomes, N. M., Rezende, C. M., Fontes, S. P., Hovell, A. M., Landgraf, R. G., Matheus, M. E., Pinto Ada, C. & Fernandes, P. D. (2008). Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich. *J Ethnopharmacol*, 119, 179–184.
- Greene, E. R., Huang, S., Serhan, C. H., & Panigrahy, D. (2011). Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 96(1-4), 27–36.
- Grimm, H., Mayer, K., Mayser, P., & Eigenbrodt, E. (2002). Regulatory potential of n-3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. *Br. J. Nutr.*, 87 (suppl.), 59–67.
- Hamid, R., Singh, J., Reddy, B. S., & Cohen, L. A. (1999). Inhibition by dietary menhaden oil of cyclooxygenase-1 and -2 in N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumors. *Int J. Oncol.*, 14, 523–528.
- Hanahan, D. & R. A. Weinberg (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5), 646–674.
- Hartmann, L., & Lago, R. C. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practices*, 22(8), 475–476.
- Hussain, M. M. (2014). Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr. Opin. Lipido.*, 25(3), 200–206.
- Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 125–138.
- IL Lee, S., Zuo, X., & Shureiqi, I. (2011). 15-Lipoxygenase-1 a tumor suppressor gene in colon cancer: is the verdict in? *Cancer Metastasis Rev*, 30(3), 481–491.
- Imamura, K., Noguchi, T., & Tanaka, T. (1986). Markers of human neuroectodermal tumors. *CRC Press, G.E.J. Staal, C.W.M. Van Veelen (Eds.)*, 191–222.
- Iñiguez, M. A., Rodriguez Volpert, O. V., Fresno, M., & Redondo, J. M. (2003). Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends Mol. Med.*, 9(2), 73–78.
- Iwamoto, L. H., Vendramini-Costa, D. B., Monteiro, P. A., Ruiz, A. L. T. G., Sousa, I. M. O., Foglio, M. A., Carvalho, J. E., & Rodrigues, R. A. F. (2015). Anticancer and anti-inflammatory activities of a standardized dichloromethane extract from *Piper umbellatum* L. leaves. *Hindawi Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1–8.
- Ixtaina, V. Y., Julio, L. M., Wagner, J. R., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2015). Physicochemical characterization and stability of chia oil microencapsulated with sodium caseinate and lactose by spray-drying. *Powder Technology*, 271, 26–34.
- Jamra, M. (1941). Histologia, fisiologia e patologia do sistema retículo-endotelial *Revista de Medicina*, Agosto, 21–30.
- Jong, E. V. (1996). Influência de dietas normo e hiperlipídicas sobre o perfil nutricional, parâmetros bioquímicos séricos e estruturais do fígado de ratos Wistar. *Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Ciência da Nutrição, Campinas*.
- Jump, D. B. (2008). N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr Opin Lipidol.*, 19(3), 242–247.
- Jump, D. B., Botolin, D., Wang, Y., Xu, J., Christian, B., & Demeure, O. (2005). Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *J. Nutrition*, 135, 2503–2506.

- Kabel, A. M., Abdel-Rahman, M. N., El-Sisi, A. E.-D. E., Haleem, M. S., Ezzat, N. M., & El Rashidy, M. A. (2013). Effect of atorvastatin and methotrexate on solid Ehrlich tumor. *European Journal of Pharmacology*, 713, 47–53.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26, 239–257.
- Key, T. J., Allen, N. E., Spencer, E. A., & Travis, R. C. (2002). The effect of diet on risk of cancer. *Lancet*, 360(9336), 861–868.
- Khan, M. Z., & He, L. (2017). The role of polyunsaturated fatty acids and GPR40 receptor in brain. *Neuropharmacology*, 113, 639–651.
- Kim, H. Y., Karanian, J. W., & Salem Jr, N. (1990). Formation of 15-lipoxygenase product from docosahexaenoic acid (22:6- ω 3) by human platelets. *Prostaglandins*, 40(5), 539–549.
- Korekane, H., Nishikawa, A., & Imamura, K. (2003). Mechanisms mediating metabolic abnormalities in the livers of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 412, 216–222.
- La Ferla, B., Airoidi, a. C., Zona, C., Orsato, A., Cardona, F., Merlo, S., Sironi, E., D'Orazio, G., & Nicotra, F. (2011). Natural glycoconjugates with antitumor activity. *Nat. Prod. Rep.*, 28, 630–648.
- Larsson, S. C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M., & Wolk, A. (2004). Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79, 935–945.
- Lee, H.-C., Liang, A., Lin, Y.-H., Guo, Y.-R., & Huang, S.-Y. (2017). Low dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio prevents induced oral carcinoma in a hamster pouch model. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*.
- Lima, E. S. & Couto, R. D. (2006). Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 42(3), 169–179.
- Loeb, W. F., & Quimby, F. W. (1999). The Clinical Chemistry of Laboratory Animals. *Clinical Enzymology*, 2 ed., 399–420.
- MacDonald-Wicks, L. K., & Garg, M. L. (2004). Incorporation of n-3 fatty acids into plasma and liver lipids of rats: importance of background dietary fat. *Lipids*, 39(6), 545–551.
- Marineli, R. S., Lenquiste, S. A., Moraes, E. A., & Maróstica Jr., M. R. (2015). Antioxidant potential of dietary chia seed and oil (*Salvia hispanica* L.) in diet-induced obese rats. *Food Research International*, 76, 666–674.
- Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Reboul, P., & Pelletier, J. P. (2003). Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs *Ann. Rheum. Dis.*, 62(6), 501–509.
- Masana, M. F., Koyanagi, A., Haro, J. M., & Tyrovolas, S. (2017). n-3 Fatty acids, Mediterranean diet and cognitive function in normal aging: a systematic review. *Exper. Gerontology*, 91, 39–50.
- Messamore, E., Almeida, D. M., Jandacek, R. J., & McNamara, R. K. (2017). Polyunsaturated fatty acids and recurrent mood disorders: phenomenology, mechanisms, and clinical application. *Progress in Lipid Research*, 66, 1–13.
- Miccadei, S., Masella, R., Mileo, A. M., & Gessani, S. (2016). ω -3 Polyunsaturated fatty acids as immunomodulators in colorectal cancer: new potential role in adjuvant therapies. *Frontiers in Immunology*, 7, 486.
- Miranda-Vilela, A. L., Grisolia, C. K., Longo, J. P. F., Peixoto, R. C. A., Almeida, M. C., Barbosa, L. C. P., Roll, M. M., Portilho, F. A., Estevanato, L. L. C., Bocca, A. L., Bão, S. N., & Lacava, Z. G. M. (2014). Oil rich in carotenoids instead of

- vitamins C and E as a better option to reduce doxorubicin-induced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice: hematological, toxicological and histopathological evaluations. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25, 1161–1176.
- Nakamura, M. T., Yudell, B. E., & Loor, J. J. (2014). Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 53, 124–144.
- Oates, J. A., Fitzgerald, G. A., Branch, R. A., Jackson, E. K., Knapp, H. R., & Roberts, L. J. (1988). Clinical implications of prostaglandin and thromboxane A₂ formation. *N. Engl. J. Med.*, 319, 689–698.
- Okada, H., & Mak, T. W. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. *Nature reviews*, 4, 592–603.
- Oliveira-Alves, S. C., Vendramini-Costa, D. B., Cazarin, C. B. B., Maróstica Jr., M. R., Ferreira, J. P. B., Silva, A. B., Prado, M. A., & Bronze, M. R. (2017). Characterization of phenolic compounds in chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, fiber flour and oil. *Food Chemistry*, 232, 295–305.
- Oloris, S. C. S., M. L. Z. Dagli & Guerra, J. L. (2002). Effect of β -carotene on the development of the solid Ehrlich tumor in mice. *Life Sciences* 71, 717–724.
- Oyedemi, S. O., Adewusi, E. A., Aiyegoro, O. A., & Akinpelu, A. D. (2011). Antidiabetic and haematological effect of aqueous extract of stem bark of *Azelaia africana* (Smith) on streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1 (5), 353–358.
- Pidgeon, P. G., Kandouz, M., Meram, A., & Honn, K. V. (2002). Mechanisms controlling cell cycle arrest and induction of apoptosis after 12-lipoxygenase inhibition in prostate cancer cells. *Cancer Res*, 62, 2721–2727.
- Pitot, H. C., Iwasaki, Y., Inoue, H., Kasper, C., & Mohrenweiser-Gann, H. (1972). Regulation of the levels of multiple forms of serine dehydratase and tyrosine aminotransferase in rat tissues. *Cancer Res.*, 13, 191–204.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey Jr., G. C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 a rodent diet. *Journal of Nutrition*, 123, 1939–1951.
- Richardson, D. S., & Johnson, S. A. (1997). Anthracyclines in haematology: preclinical studies, toxicity and delivery systems *Blood Reviews*, 11, 201–223.
- Reflotron (2010). *Manual de Instruções da Roche Diagnostics*. Roche Diagnostics.
- Rose, D. P., & Connolly, J. M. (1999). Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents *Pharmacology & Therapeutics*, 83, 217–244.
- Ruiz-Núñez, B., Dijck-Brouwer, D. A. J., & Muskiet, F. A. J. (2016). The relation of saturated fatty acids with low-grade inflammation and cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 36, 1–20.
- Saavedra-García, P., Nichols, K., Mahmud, Z., Yuen-Nam Fan, L., & Lam, E. W.-F. (2017). Unravelling the role of fatty acid metabolism in cancer through the FOXO3-FOXO1 axis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1–11.
- Sherlock, S. (1985). Diseases of the Liver and Biliary System. 7th ed. Oxford: Blackwell, 1–59.
- Simopoulos, A. P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med.(Maywood)*, 233(6), 674–688.
- Singh, J., Hamid, R., & Reddy, B. S. (1997). Dietary fat and colon cancer: modulation of cyclooxygenase-2 by types and amount of dietary fat during the postinitiation stage of colon carcinogenesis. *Cancer Res*, 57, 3465–3470.

- Souza, N. E., & Visentainer, J. V. (2012). Colesterol da mesa ao corpo. *Eduem*, 2 ed., Maringá, 27–28.
- Sozen, E., & Ozer, N. K. (2017). Impact of high cholesterol and endoplasmic reticulum stress on metabolic diseases: an updated mini-review. *Redox Biology*, 12, 456–461.
- Subramani, S., Gajendren, S., Mahadevan, J., Jayachandran, M., Udaiyar, M., & Vinayagam, R. (2014). Ameliorating effect of eugenol on hyperglycemia by attenuating the key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem*, 385, 159–168.
- Tacar, O., Sriamornsak, P., & Dass, C. R. (2013). Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65, 157–170.
- Talmadge, J. E. & Gabrilovich, D. I. (2013). History of myeloid derived suppressor cell (MDSCs) in the macro- and micro-environment of tumour-bearing hosts. *Nature Reviews Cancer*, 13(10), 739–752.
- Tang, S., Bhatia, B., Maldonado, C. J., Yang, P., Newman, R. A., Liu, J., Chandra, D., Traag, J., Klein, R. D., Fischer, S. M., Chopra, D., Shen, J., Zhau, H. E., Chung, L. W. K., & Tang, D. G. (2002). Evidence that arachidonate 15-lipoxygenase 2 is a negative cell cycle regulator in normal prostate epithelial cells. *J Biol chem*, 277, 16189–16201.
- Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., & Altmana, R. B. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet. Genomics*, 21, 440–446.
- Thrall, M. A., Baker, D. C., Campbell, T. W., DeNicola, D., Fettman, M. J., & Lassen, E. D. (2007). Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. *Editora Roca 1st ed. São Paulo, Brasil*.
- Timilsena, Y. P., Wang, B., Adhikari, R., & Adhikari, B. (2017). Advances in microencapsulation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs)-rich plant oils using complex coacervation: a review. *Food Hydrocolloids*, 69, 369–381.
- Tsutsumi, S., Haruna, R., Tomisato, W., Takano, T., Hoshino, T., Tsuchiya, T., & Mizushima, T. (2002). Effects of prostaglandins on spontaneous apoptosis in gastric mucosal cells. *Digestive Diseases and Sciences*, 47, 84–89.
- Vendramini-Costa, D. B., Francescone, R., Posocco, D., Hou, V., Dmitrieva, O., Hensley, H., Carvalho, J. E., Pilli, R. A., & Grivennikov, S. I. (2017). Anti-inflammatory natural product goniotalamin reduces colitis-associated and sporadic colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 38(1), 51–63.
- Vendramini-Costa, D. B., & Carvalho, J. E. (2012). Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 18, 3831–3852.
- Vendramini-Costa, D. B., Castro, I. B. D., Ruiz, A. L. T. G., Marquissolo, C., Pilli, R. A., & Carvalho, J. E. (2010). Effect of goniotalamin on the development of Ehrlich solid tumor in mice. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 6742–6747.
- Verçosa Júnior, D., Souza-Fagundes, E. M., Cassali, G. D., Ribeiro, E. L., Zani, C. L., & Melo, M. M. (2006). Efeito do miriadenolídeo isolado de *Alomia myriadenia* (Asteraceae) sobre o tumor de Erlich ascítico no camundongo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58(5), 788–798.
- Wang, D., & Dubois, R. N. (2010). Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer*, 10(3), 181–193.

- Wang, W., Zhu, J., Lyu, F., Panigrahy, D., Ferrara, K. W., Hammock, B., & Zhang, G. (2014). ω -3 Polyunsaturated fatty acids-derived lipid metabolites on angiogenesis, inflammation and cancer. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 113–115, 13–20.
- Zhang, G., Panigrahy, D., Mahakian, L. M., Yang, J., Liu, J.-Y., Lee, K. S. S., Wettersten, H. I., Ulu, A., Hu, X., Tam, S., Hwang, S. H., Ingham, E. S., Kieran, M. W., Weiss, R. H., Ferrara, K. W., & Hammock, B. D. (2013). Epoxy metabolites of docosahexaenoic acid (DHA) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis. *PNAS*, 110(16), 6530–6535.
- Ziboh, V. A., Miller, C. C., & Cho, Y. (2000). Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. *Am J Clin Nutr*, 71(1 Suppl.), 361s–366s.

DISCUSSÃO GERAL

Estudos sobre a composição química dos produtos vegetais são sempre um desafio, uma vez que grande número de diferentes classe de compostos podem estar presentes em diferentes concentrações e forma, tais como na forma livre ou ligada à outra estrutura. A carência de dados sobre a composição química dos produtos da chia é reconhecida e a medida que o seu consumo aumenta, torna-se cada vez mais importante realizar estudos de caracterização para identificar os compostos bioativos presentes na mesma, bem como estabelecer parâmetros de controle de qualidade para avaliar os produtos comercializados (sementes, farinha fibrosa e óleo) que estão atualmente disponíveis para os consumidores.

O conteúdo fenólico total dos extratos brutos e hidrolisados da semente e farinha fibrosa de chia não apresentaram diferença, porém os extratos do óleo apresentaram valores extremamente baixos. As análises cromatográficas confirmam que a composição química de ambos extratos, semente e farinha fibrosa, são similares, enquanto que os extratos do óleo são diferentes.

Nas análises cromatográficas por HPLC-DAD-ESI-MS/MS foram identificados 14 derivados dos ácidos fenólicos nos extratos brutos e 21 nos extratos hidrolisados, sendo majoritários, o ácido caféico, danshensu, ácido rosmarínico, ácido salvianólico C e ácido salvianólico E. Alguns destes compostos são eletroquimicamente ativos sob as condições de análise e podem estar relacionados com a atividade antioxidante dos extratos. O procedimento de hidrólise ácida permitiu identificar mais ácidos fenólicos na semente e farinha de chia. Os resultados obtidos com os extratos hidrolisados podem indicar que após o consumo da semente e farinha fibrosa de chia, durante o processo de digestão, podem ocorrer um aumento na atividade antioxidante, embora um modelo de digestão deve ser usado para confirmar essa hipótese.

O óleo da semente de chia possui elevado teor de ácidos graxos α -linolênico ($63,02 \pm 0,01$ g/100 g). O baixo consumo de ácidos graxos saturados e a maior ingestão de ω 3-PUFA na dieta contribuiu para redução dos níveis séricos de colesterol e aumento do teor de ω 3-PUFA no fígado dos animais. De acordo com Martin *et al.* (2006), os ω 3-PUFA são metabolizados pelos mesmos sistemas enzimáticos alongase e dessaturase, sendo os mesmos para os ω 6-PUFA, no entanto, os passos de dessaturação nesta via são mostrados como sendo preferíveis aos ω 3-PUFA comparados com os ω 6-PUFA.

Pesquisas *in vivo* relatam que o consumo de dietas com elevado teor de ω 3-PUFA, especificamente o ácido α -linolênico, tem reduzido os níveis séricos de colesterol total (Kim & Choi, 2001; Zhao *et al.*, 2004; et al., Khalatbari Soltani *et al.* 2013; Dittrich *et al.*, 2015).

Portanto este estudo avaliou os efeitos da ingestão de dieta contendo semente, farinha fibrosa e óleo de chia quanto aos níveis séricos de colesterol total e frações, assim como determinou o teor dos ácidos graxos no tecido hepático dos camundongos Balb/C saudáveis.

Vinte camundongos Balb/C machos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n=5): o grupo controle consumiu a dieta AIN-93M e demais grupos consumiram suas respectivas dietas AIN-93M modificadas, com adição de 20 % de semente de chia, 20 % de farinha fibrosa de chia ou 7 % de óleo de chia, no período de 35 dias. Os camundongos que consumiram dieta com 7 % de óleo de chia e 20 % de semente de chia apresentaram redução significativa nos níveis séricos de colesterol total, 19,76 % e 12,88 %, respectivamente em comparação com o grupo controle.

A ingestão de dieta com 7 % de óleo de chia reduziu significativamente o teor de lipídeos hepáticos em 32,28 % em comparação com a dieta controle. A composição dos ácidos graxos no tecido hepático dos animais apresentou aumento significativo no teor do ácido α -linolênico e uma menor proporção de ácidos graxos (ω 6/ ω 3)-PUFA para o grupos que consumiram dieta contendo semente e óleo de chia. De acordo com os resultados, a semente e óleo de chia são uma importante fonte de ácidos graxos ômega 3 e uma alternativa de consumo para contribuir na redução dos níveis séricos de colesterol total.

Estudos recentes relatam que a ingestão diária de componentes bioativos, entre eles, os compostos fenólicos e ácidos graxos poli-insaturados presentes nas sementes de chia, promoveram redução de doenças cardiovasculares (Ayerza & Coates, 2007; Croft, 2016), efeito hepatoprotetor (Poudyal *et al.*, 2012), controle da diabetes (Ho *et al.*, 2013) e efeito protetor contra doenças relacionadas à obesidade (Marineli *et al.*, 2015).

A busca por agentes preventivos e terapêuticos, na prevenção e controle do câncer, ainda representa um desafio para os pesquisadores, devido às características peculiares de cada tipo de câncer (Vendramini-Costa *et al.*, 2017). Portanto neste estudo, avaliamos o efeito da semente, farinha fibrosa e óleo de chia incorporado à dieta em um modelo experimental de tumor sólido de Ehrlich.

Setenta e oito camundongos Balb/C machos foram distribuídos aleatoriamente em grupos (n=6/por grupo): o grupo controle e o grupo tratado com doxorrubicina foram alimentados com a dieta do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93M), e demais grupos foram alimentados com suas respectivas dietas AIN-93M com adição de 10 %, 15 % e 20 % de semente; 10 %, 15 % e 20 % farinha fibrosa de chia, e 5 %, 6 % e 7 % de óleo de chia no período de 56 dias.

De acordo com os resultados, os animais tratados com as dietas contendo 10 %, 15 % e 20 % de semente de chia e 20 % de farinha fibrosa de chia apresentaram redução média de 24 % na massa tumoral em comparação com o grupo controle, porém os grupos que consumiram 10 % e 15 % de farinha fibrosa não exibiram redução da massa tumoral. Do mesmo modo, o grupo tratado com as dietas contendo 5 %, 6 % e 7 % de óleo de chia apresentaram redução média de 55 % na massa tumoral em relação ao grupo controle.

Comparando os resultados obtidos nos ensaios do óleo e semente de chia. Observa-se que o consumo de dieta com óleo de chia diminuiu significativamente o crescimento da massa tumoral em relação ao grupo controle. Os animais tratados com as dietas contendo 5 %, 6 % e 7 % de óleo de chia apresentaram menor crescimento tumoral, sendo a sua atividade antitumoral semelhante ao do quimioterápico doxorrubicina.

O consumo diário da dieta contendo semente e óleo de chia não promoveu sinais de toxicidade nos animais, diferente do grupo tratado com doxorrubicina, que apresentou alterações nos parâmetros hematológicos.

O consumo de semente e óleo de chia pode ser uma alternativa importante na contribuição da redução dos níveis séricos de colesterol total e um potencial a ser explorado em estudos futuros, a fim de confirmar sua ação antitumoral em modelos crônicos de carcinogênese.

CONCLUSÃO GERAL

A semente de chia apresenta elevado teor de proteínas, lipídeos e fibras alimentares. Os principais ácidos graxos presentes na semente, farinha fibrosa e óleo são o ácido linoléico e α -linolênico. Os minerais predominantes na semente e farinha de chia são o cálcio, magnésio, potássio e ferro. Os compostos fenólicos majoritários identificados na semente e farinha fibrosa de chia são os ácidos fenólicos, entre eles, o ácido caféico, danshensu, ácido rosmarínico, ácido salvianólico C e ácido salvianólico E.

Os camundongos que consumiram dieta com 7 % de óleo e 20 % de semente no período de 35 dias apresentaram redução nos níveis séricos de colesterol total, 19,76 % e 12,88 %, respectivamente. De acordo com os resultados, podemos inferir que a semente e óleo de chia, nas concentrações estudadas, apresentaram efeito hipocolesterolêmico nos camundongos Balb/C saudáveis. Desta forma, conclui-se que a semente e óleo de chia são uma importante fonte de ômega 3 e uma alternativa de consumo para contribuir na redução dos níveis séricos de colesterol total.

O consumo da semente de chia na dieta durante 56 dias diminuiu o crescimento da massa tumoral no modelo experimental de tumor sólido de Ehrlich em camundongos machos Balb/C. De acordo com os resultados, os animais tratados com as dietas contendo 10 %, 15 % e 20 % de semente de chia e 20 % de farinha fibrosa de chia apresentaram redução média de 24 % da massa tumoral em relação ao grupo controle. Do mesmo modo, o consumo do óleo de chia na dieta reduziu significativamente o crescimento da massa tumoral, apresentando redução média de 55 % da massa tumoral em comparação com o grupo controle. De acordo com os resultados, os animais tratados com as dietas contendo 5 %, 6 % e 7 % de óleo de chia apresentaram menores tumores em comparação com o grupo controle, sendo a atividade antitumoral semelhante ao do quimioterápico doxorubicina.

O consumo da semente e do óleo de chia pode ser uma alternativa importante de fonte de ácidos graxos ômega-3 e sugere o seu uso como alimento funcional na ingestão diária. Portanto, estes resultados fornecem novas informações sobre a atividade antioxidante, efeito hipocolesterolêmico e antitumoral da semente e óleo de chia.

REFERÊNCIAS GERAIS

- Abdel-Rahman, M. N., & Kabel, A. M. (2012). Comparative study between the effect of methotrexate and valproic acid on solid Ehrlich tumour. *Journal of the Egypt. Nat. Can. Institute*, 24, 161–167.
- Abu-Reidah, I. M., Contreras, M. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Reversed-phase ultra-high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization–quadrupole–time-of-flight mass spectrometry as a powerful tool for metabolic profiling of vegetables: *Lactuca sativa* as an example of its application. *J Chromatogr A*, 1313, 212–227.
- Ackerman, D., & Simon, C. (2014). Hypoxia, lipids, and cancer: surviving the harsh tumor microenvironment. *Tren. Cell Biology*, 24(8), 472–478.
- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46–55.
- Adams, C. A. (1999). Oxidations and antioxidants. In: *Nutricines. Food components in Health and Nutrition. Nottingham Univ. Press., Chapter 2*, 11–34.
- Akoh, C. C., & Min, D. B. (2008). Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology. *CRC Press, Third edition*, 393–394.
- Álvarez-Chávez, L. M., Valdivia-López, M. L. A., Aburto-Juárez, M. L., & Tecante, A. (2008). Chemical characterization of the lipid fraction of mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.). *Intern. Journal of Food Properties*, 11(3), 687–697.
- Álvarez, R. M. A., & Casellas, N. M. (2011). Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6 en el riesgo de cáncer de mama. *Rev Esp Nutr Hum Diet.*, 15(4), 189–193.
- AMC. (1987). Analytical Methods Committee. Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit. *Analyst*, 112, 199–204.
- Anderson, J. W., Baird, P., Davis, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., & Koraym, A. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutr. Reviews*, 67(4), 188–205.
- AOAC (2006). Official Methods of Analysis of AOAC International 18th. *Gaithersburg. AOAC International*.
- AOCS (2004). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. *AOCS: Champaign*.
- AOCS (2009). Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. *AOCS Press, Champaign, USA*.
- Araújo, F. T. M., Teixeira, A. C. P., Araújo, M. S. S., Silva, C. H., Negrão-Corrêa, D. A., Martins-Filho, O. A., Peruhype-Magalhães, V., & Teixeira-Carvalho, A. (2015). Establishment of reference values for hematological and biochemical parameters of mice strains produced and biochemical parameters of mice strains produced in the animal facility at centro de pesquisas René Rachou/Fiocruz - Minas Gerais. *RESBCAL*, 3(2), 95–102.
- Atwater, W. O., & Bryant, A. P. (1900). The availability and fuel value of food materials. *Washington, DC: US Government Printing Office, Agric. Expert Station, 12th Annual Report*, 73–110.
- AVMA. (2007). AVMA guidelines on euthanasia.
- Ayerza, R. (1995). Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.) from five northwestern locations in Argentina. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72, 1079–1081.
- Ayerza, R. (2013). Seed composition of two chia (*Salvia hispanica* L.) genotypes which differ in seed color. *Emir. J. Food Agric.*, 25(7), 495–500.

- Ayerza, R., & Coates, W. (2004). Composition of chia (*Salvia hispanica*) grown in six tropical and subtropical ecosystems of South America. *Trop. Sci.*, *44*, 131–135.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2005). Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. *Nutr. Research*, *25*, 995–1003.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2007). Effect of dietary α -linolenic fatty acid derived from chia when fed as ground seed, whole seed and oil on lipid content and fatty acid composition of rat plasma. *An. of Nutr. Metabolism*, *51*, 27–34.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2009). Influence of environment on growing period and yield, protein, oil and α -linolenic content of three chia (*Salvia hispanica* L.) selections. *Ind. Cr. and Products*, *30*, 321–324.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2011). Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Ind. Cr. and Products*, *34*, 1366–1371.
- Badimon, L., & Vilahur, G. (2012). LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos. *Annals of the New York Acad. of Sciences*, *1254*, 18–32.
- Bahr, H. I., Toraih, E. A., Mohammed, E. A., Mohammadc, H. M. F., Ali, E. A. I., & Zaitone, S. A. (2015). Chemopreventive effect of leflunomide against Ehrlich's solid tumor grown in mice: effect on EGF and EGFR expression and tumor proliferation. *Life Sci.*, *141*, 193–201.
- Bajoub, A., Pacchiarotta, T., Hurtado-Fernández, E., Olmo-García, L., García-Villalba, R., Fernández-Gutiérrez, A., Mayboroda, O. A., & Carrasco-Pancorbo, A. (2016). Comparing two metabolic profiling approaches (liquid chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometry) for extra-virgin olive oil phenolic compounds analysis: a botanical classification perspective. *J. of Chromatography A*, *1428*, 267–279.
- Ballus, C. A., Quirantes-Piné, R., Bakhouch, A., Silva, L. F. O., Oliveira, A. F., Coutinho, E. F., Croce, D. M., Segura-Carretero, A., & Godoy, H. T. (2015). Profile of phenolic compounds of Brazilian virgin olive oils by rapid resolution liquid chromatography coupled to electrospray ionisation time-of-flight mass spectrometry (RRLC–ESI-TOF-MS). *F. Chemistry*, *170*, 366–377.
- Batista, A. G., Lenquiste, S. A., Cazarin, C. B. B., Silva, J. K., Luiz-Ferreira, A., Bogusz Jr., S., Hantao, L. W., Souza, R. N., Augusto, F., Prado, M. A., & Marostica Jr., M. R. (2014). Intake of jaboticaba peel attenuates oxidative stress in tissues and reduces circulating saturated lipids of rats with high-fat diet-induced obesity. *J. of Funct. Foods*, *6*, 450–461.
- Becerra-Herrera, M., Sánchez-Astudillo, M., Beltrán, R., & Sayago, A. (2014). Determination of phenolic compounds in olive oil: new method based on liquid micro extraction and ultra high performance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry. *F. Sci. and Technology*, *57*, 49–57.
- Beljkaš, B., Matić, J., Milovanović, I., Jovanov, P., Mišan, A., & Šarić, L. (2010). Rapid method for determination of protein content in cereals and oilseeds: validation, measurement uncertainty and comparison with the Kjeldahl method. *Accred. and Qual. Assurance*, *15*(10), 555–561.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Ana. Biochemistry*, *239*(1), 70–76.
- Bernaude, F. S. R., & Rodrigues, T. C. (2013). Fibra alimentar – Ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, *57*(6), 397–405.

- Bianchi, M. L. P., & Antunes, L. M. G. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. de Nutrição*, 12(2), 123–130.
- Bincoletto, C., Eberlin, S., Figueiredo, C. A. V., Luengo, M. B., & Queiroz, M. L. S. (2005). Effects produced by Royal Jelly on haematopoiesis: relation with host resistance against Ehrlich ascites tumour challenge. *Inter. Immunopharmacology*, 5, 679–688.
- Blasco, A. J., Crevillén, A. G., González, M. C., & Escarpa, A. (2007). Direct electrochemical sensing and detection of natural antioxidants and antioxidant capacity in vitro systems. *Electroanalysis*, 19(22), 2275–2286.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *J Biochem Physiol*, 37(8), 911–917.
- Bodoira, R. M., Penci, M. C., Ribotta, P. D., & Martínez, M. L. (2017). Chia (*Salvia hispanica* L.) oil stability: study of the effect of natural antioxidants. *Food Sci. and Technology*, 75, 107–113.
- Boonyarikpunchai, W., Sukrong, S., & Towiwat, P. (2014). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl. *Pharm., Bioch. and Behavior.*, 124, 67–73.
- Borrás-Linares, I., Stojanović, Z., Quirantes-Piné, R., Arráez-Román, D., Švarc-Gajić, J., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2014). *Rosmarinus officinalis* leaves as a natural source of bioactive compounds. *Int. J. Molr Sciences*, 15, 20585–20606.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.l Biochemistry*, 72, 248–254.
- BRASIL - ANVISA (1978). Resolução - CNNPA nº 12, Padrões de identidade e qualidade para os alimentos e bebidas. *Diário Ofic. da Rep. Fed. do Brasil*.
- BRASIL - ANVISA (2003). RDC 360 - Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. *Diário Ofic.da Rep. Fed. do Brasil*.
- Bravo, M. N., Silva, S., Coelho, A. V., Vilas Boas, L., & Bronze, M. R. (2006). Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. *Ana. Chimica Acta*, 563, 84–92.
- Brian, D., Craft, A. L., Kerrihard, R. A., & Ronald, B. (2012). Pegg Phenol-Based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Compr. Ver. in Food Sci. and Food Safety*, 11.
- Bronte, V., & Pittet, M. J. (2013). The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity*, 39(5), 806–818.
- Brownlee, I. A., Chater, P. I., Pearson, J. P., & Wilcox, M. D. (2016). Dietary fibre and weight loss: where are we now? *Food Hydrocolloids*, 1–6.
- Buchholz, A. C., & Schoeller, D. A. (2004). Is a calorie a calorie? *Am J Clin. Nutrition*, 79(suppl), 899S–906S.
- Bushway, A. A., Belyea, P. R., & Bushway, R. J. (1981). Chia seed as a source of oil, polysaccharide, and protein. *J. of Food Science*, 46, 1349–1356.
- Busilacchi, H., Quiroga, M., Bueno, M., Di Sapio, O., Flores, V., & Severin, C. (2013). Evaluation of *Salvia hispanica* L. cultivated in the south of Santa Fe (Argentina). *Cult. Tropicales*, 34(4), 55–59.
- Cabeza, L., Ortiz, R., Prados, J., Delgado, A. V., Martín-Villena, M. J., Clares, B., Perazzoli, G., Entrena, J. M., Melguizo, C., & Arias, J. L. (2017). Improved antitumor activity and reduced toxicity of doxorubicin encapsulated in poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles in lung and breast cancer treatment: an in vitro and in vivo study. *Europ. J. of Pharm. Sciences*, 102, 24–34.

- Cagel, M., Grotz, E., Bernabeu, E., Moretton, M. A., & Chiappetta, D. A. (2017). Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. *Drug Discovery Today*, 22(2), 270–281.
- Cahill, J. P. (2003). Ethnobotany of chia, *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae). *Econ. Botany*, 57, 604–618.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Lif. Sciences*, 74, 2157–2184.
- Cao, G., Booth, S. L., Sadowski, J. A., & Prior, R. L. (1998). Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am J Clin Nutr*, 68, 1081–1087.
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Fr. Rad. Biol. and Medicine*, 22, 749–760.
- Capitani, M. I., Spotorno, V., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2012). Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *F. Sci. and Technology*, 45, 94–102.
- Carvalho, L. M. J., Gomes, P. B., Godoy, R. L. O., Pacheco, S., Monte, P. H. F., Carvalho, J. L. V., Nutti, M. R., Neves, A. C. L., Vieira, A. C. R. A., & Ramos, S. R. R. (2012). Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): a preliminary study. *F. Res. International*, 47, 337–340.
- Cathcart, M. C., Lysaght, J., & Pidgeon, G. P. (2011). Eicosanoid signalling pathways in the development and progression of colorectal cancer: novel approaches for prevention/intervention. *Can. Metastasis Rev*, 30(3), 363–385.
- Cazarin, C. B. B., da Silva, J. K., Colomeu, T. C., Batista, A. G., Meletti, L. M. M., Paschoal, J. A. R., Bogusz, S., Braga, P. A. D., Reyes, F. G. R., Augusto, F., de Meirelles, L. R., Zollner, R. D., & Marostica, M. R. (2015). Intake of *Passiflora edulis* leaf extract improves antioxidant and anti-inflammatory status in rats with 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid induced colitis. *J. of Funct. Foods*, 17, 575–586.
- Chaabane, W., User, S. D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J., & Łos, M. J. (2013). Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 61, 43–58.
- Chandrasekara, A., & Shahidi, F. (2011). Determination of antioxidant activity in free and hydrolyzed fractions of millet grains and characterization of their phenolic profiles by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. *J. of Funct. Foods*, 3, 144–158.
- Chang, W. C., Kuo, P. L., Chen, C. W., Wu, J. S. B., & Shen, S. C. (2015). Caffeic acid improves memory impairment and brain glucose metabolism via ameliorating cerebral insulin and leptin signaling pathways in high-fat diet-induced hyperinsulinemic rats. *F. Res. Internacional*, 77, 24–33.
- Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S. S., & Webb, C. (2002). Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *Int. J. of Food Microbiology*, 79, 131–141.
- Chen, H., Zhang, Q., Wang, X., Yang, J., & Wang, Q. (2011). Qualitative analysis and simultaneous quantification of phenolic compounds in the aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* by HPLC-DAD and ESI/MSⁿ. *Phyt. Analysis*, 22, 247–257.
- Chen, J. H., Ling, R., Yao, Q., Li, Y., Chen, T., Wang, Z., & Li, K. Z. (2005). Effect of small-sized liposomal Adriamycin administered by various routes on a metastatic

- breastcancer model. *Endocr. Relat. Cancer*, 12, 93–100.
- Chen, Y., & Li, P. (2016). Fatty acid metabolism and cancer development. *Sci. Bull.*, 61(19), 1473–1479.
- Cheuk, B. L., Chew, S. B., Fiscus, R. R., & Wong, P. Y. (2002). Cyclooxygenase-2 regulates apoptosis in rat epididymis through prostaglandin D₂. *Biol. Reprod.*, 66, 374–380.
- Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comp. ver. in food sci. and food safety.*, 5, 179–186.
- Choi, H., Kim, H. C., Stefani, K. M., Lee, J.-M., Yoon, Y. M., Lee, E. Y., Kim, K. M., Rhee, Y., Youm, Y., & Kim, C. O. (2017). Serum high-density lipoprotein cholesterol concentration and functional state: The Korean Urban Rural Elderly (KURE) Study. *Arch. of Ger. and Geriatrics*, 71, 115–121.
- Chong, C.-M., Zhou, Z.-Y., Razmovski-Naumovski, V., Cui, G.-Z., Zhang, L.-Q., Sa, F., Hoi, P.-M., Chan, K., & Lee, S. M.-Y. (2013). Danshensu protects against 6-hydroxydopamine-induced damage of PC12 cells in vitro and dopaminergic neurons in zebrafish. *Neur. Letters*, 543, 121–125.
- Choo, W.-S., Birch, J., & Dufour, J.-P. (2007). Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed flaxseed oils. *J. of F. Composition and Analysis*, 20, 202–211.
- Chulada, P. C., Thompson, M. B., & Mahler, J. F. (2000). Genetic disruption of Ptg_s 1, as well Ptg_s-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer Res.*, 60, 4705–4708.
- Ciftci, O. N., Przybylski, R., & Rudzinska, M. (2012). Lipid components of flax, perilla, and chia seeds. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 114, 794–800.
- Clifford, M. N., & Scalbert, A. (2000). Ellagitannins-occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *J. of the Sci. of F. and Agriculture*, 80, 1118–1125.
- Coates, W., & Ayerza, R. (1996). Production potential of chia in northwestern Argentina. *Ind. l Cr. and Products*, 5, 229–233.
- Codex Alimentarius (2003). World Health Organization Codex Alimentarius Commission Joint WHO/FAO, Codex Stan 33 – Codex standard for olive oils and olive pomace oils. *Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Geneve: WHO/FAO(1981 (Rev. 2-2003))*, 1–9.
- Codex Alimentarius – Commission, C. A. (2001). Codex standard for edible fats and oils not covered by individual standards. *Secretariat of the Joint FAO/WHO Food Standards Programme, FAO, Rome*, 8, 28.
- Coelho, M. S., & Salas-Mellado, M. M. (2014). Revisão: Composição química, propriedades funcionais e aplicações tecnológicas da semente de chia (*Salvia hispanica* L) em alimentos. *Braz. J. Food Technol.*, 17(4), 259–268.
- Coelho, V. R., Vieira, C. G., Souza, L. P., Moysés, F., Basso, C., Papke, D. K. M., Pires, T. R., Siqueira, I. R., Picada, J. N., & Pereira, P. (2015). Antiepileptogenic, antioxidant and genotoxic evaluation of rosmarinic acid and its metabolite caffeic acid in mice. *Lif. Sciences*, 122, 65–71.
- Colussi, G., Catena, C., Novello, M., Bertin, N., & Sechi, L. A. (2017). Impact of omega-3 polyunsaturated fatty acids on vascular function and blood pressure: Relevance for cardiovascular outcomes. *Nutr., Metab. & Card. Diseases*, 27, 191–200.
- Coorey, R., Tjoe, A., & Jayasena, V. (2014). Gelling properties of chia seed and flour. *J. of F. Science*, 79(5), 859–866.
- Corey EJ, Shih C, & JR., C. (1983). Docosahexaenoic acid is a strong inhibitor of prostaglandin but not leukotriene biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80,

- 3581–3584.
- Cosio, M. S., Buratti, S., Mannino, S., & Benedetti, S. (2006). Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the *Labiatae* family. *F. Chemistry*, 97, 725–731.
- Crawford, M., Galli, C., Visioli, F., Renaud, S., Simopoulos, A. P., & Spector, A. A. (2000). Role of plant-derived omega-3 fatty acids in human nutrition. *Ann Nutr Metab*, 44, 263–265.
- Croft, K. D. (2016). Dietary polyphenols: Antioxidants or not. *Arch. of Biochemistry and Biophysics*, 595, 120–124.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Reports*, 26, 1001.
- Culp, B. R., Titus, B. G., & Lands, W. E. (1979). Inhibition of prostaglandin biosynthesis by eicosapentaenoic acid. *Prostaglandins Med*, 3, 269–278.
- Cvetkovikj, I., Stefkov, G., Acevska, J., Petreska Stanoeva, J., Karapandzova, M., Stefova, M., Dimitrovska, A., & Kulevanova, S. (2013). Polyphenolic characterization and chromatographic methods for fast assessment of culinary *Salvia* species from South East Europe. *J. of Chromatography A*, 1282, 38–45.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, 43(4), 348–361.
- Das, U. N. (2006). Essential fatty acids - a review. *Cur. Pharm. Biotechnology*, 7, 467–482.
- De Silva, S., Francis, D. S., & Tacon, A. G. (2011). Fish oil in aquaculture: In retrospect. *In Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds*, 1–20.
- Deronic, A., Leanderson, T., & Ivars, F. (2016). The anti-tumor effect of the quinoline-3- carboxamide tasquinimod : blockade of recruitment of CD11b⁺ Ly6C^{hi} cells to tumor tissue reduces tumor growth. *BMC Cancer*, 16(440), 1–15.
- Dittrich, M., Jahreis, G., Bothor, K., Drechsel, C., Kiehntopf, M., Bluher, M., & Dawczynski, C. (2015). Benefits of foods supplemented with vegetable oils rich in alpha-linolenic, stearidonic or docosahexaenoic acid in hypertriglyceridemic subjects: a double-blind, randomized, controlled trial. *Eur J Nutr.*, 54(6), 881–893.
- Dobes, J., Zitka, O., Sochor, J., Ruttkay-Nedecky, B., Babula, P., Beklova, M., Kynicky, J., Hubalek, J., Klejdus, B., Kizek, R., & Adam, V. (2013). Electrochemical tools for determination of phenolic compounds in plants, a review. *Int. J. Electroch. Science*, 8, 4520–4542.
- Doss, H. M., Dey, C., Sudandiradoss, C., & Rasool, M. K. (2016). Targeting inflammatory mediators with ferulic acid, a dietary polyphenol, for the suppression of monosodium urate crystal-induced inflammation in rats. *Life Sciences*, 148, 201–210.
- DRI - Dietary Reference Intake (1997). Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride. *Institute of Medicine*, Washington (DC): National Academy Press.
- DRI - Dietary Reference Intake (2001). Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *Institute of Medicine*, Washington (DC): National Academy Press.

- DRI - Dietary Reference Intake (2005). Dietary reference intakes for water, potassium, sodium, chloride and sulfate. *Institute of Medicine*, Washington (DC): National Academy Press.
- Dumas, J.-F., Brisson, L., Chevalier, S., Mahéo, K., Fromont, G., Moussata, D., Besson, P., & Roger, S. (2017). Metabolic reprogramming in cancer cells, consequences on pH and tumour progression: Integrated therapeutic perspectives with dietary lipids as adjuvant to anticancer treatment. *Sem. in Cancer Biology*.
- Ehrlich, P. (1906). Experimentelle karzinom-studien an mäuse. *Arch. Insect. Exp. Ther.* 165.
- Elsherbiny, N. M., Younis, N. N., Shaheen, M. A., & Elseweidy, M. M. (2016). The synergistic effect between vanillin and doxorubicin in ehrlich ascites carcinoma solid tumor and MCF-7 human breast cancer cell line. *Pathology – Res. and Prac.* 212, 767–777.
- Emdin, M., Pompella, A., & Paolicchi, A. (2005). Gamma-glutamyltransferase, atherosclerosis, and cardiovascular disease: triggering oxidative stress within the plaque. *Circulation*, 112, 2078–2080.
- Espada, C. E., Berra, M. A., Martinez, M. J., Eynard, A. R., & Pasqualini, M. E. (2007). Effect of chia oil (*Salvia hispanica*) rich in ω -3 fatty acids on the eicosanoid release, apoptosis and T-lymphocyte tumor infiltration in a murine mammary gland adenocarcinoma. *Plast., Leuk. and essential fatty acids*, 77(1), 21–28.
- Esposito, F., Arlotti, G., Bonifati, A. M., Napolitano, A., Vitale, D., & Fogliano, V. (2005). Antioxidant activity and dietary fibre in durum wheat bran by-products. *Food Res. International*, 38, 1167–1173.
- Esposito, K., Marfella, R., Ciotola, M., Di Palo, C., Giugliano, F., Giugliano, G., D'Armiento, M., D'Andrea, F., & Giugliano, D. (2004). Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: A randomized trial. *J. of the Am. Med. Association*, 292(12), 1440–1446.
- Fahrioglu, U., Dodurga, Y., Elmas, L., & Seğme, M. (2016). Ferulic acid decreases cell viability and colony formation while inhibiting migration of MIA PaCa-2 human pancreatic cancer cells in vitro. *Gene*, 576, 476–482.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2012). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base N°. 11. Available from: <http://globocan.iarc.fr>. [cited 2015 July 30].
- Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G. H. A. (1957). A simple methods for the insolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol chem*, 226, 497–507.
- Fonteles, A. A., Souza, C. M., Neves, J. C. S., Menezes, A. P. F., Carmo, M. R. S., Fernandes, F. D. P., Araújo, P. R., & Andrade, G. M. (2016). Rosmarinic acid prevents against memory deficits in ischemic mice. *Behav. Brain Research*, 297, 91–103.
- Forti, N., & Diament, J. (2007). Apolipoproteínas B e A-I: fatores de risco cardiovascular ? *Rev Assoc Med Bras*, 53(3), 276–282.
- Fuchs-Tarlovsky, V. (2013). Role of antioxidants in cancer therapy. *Nutrition*, 29, 15–21.
- Funk, C. D. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 294(5548), 1871–1875.
- Garcia, E., & Winter, C. K. (2017). Chapter 23 – Diet and Cancer. *Food Diseases*, Third edition, 459–472.

- Garg, M. L., Thomson, A. B., & Clandinin, M. T. (1990). Interactions of saturated, n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids to modulate arachidonic acid metabolism. *J Lipid Res*, 31, 271–277.
- Garis D, Skiada V, & A., B. (2008). Redox signaling and cancer: The role of “labile” iron. *Cancer Lett.*, 266, 21–29.
- Gherman, C., Pileczki, V., Petric, R. C., Braicu, C., Răpuncean, S., & Neagoe, I. B. (2012). In vitro studies for evaluation the antitumoral and immunomodulator effect of EGCG on Ehrlich ascites. *Arch. Zootech.*, 5(2), 79–87.
- Gomes, N. M., Rezende, C. M., S.P., F., Hovell, A. M., G., L. R., Matheus, M. E., C., P. A., & D., F. P. (2008). Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich. *J Ethnopharmacol*, 119, 179–184.
- Gómez-Romero, M., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. *Phytochemistry*, 71, 1848–1864.
- Graham, R. D., Welch, R. M., Saunders, D. A., Ortiz-Monasterio, I., Bouis, H. E., Bonierbale, M., de Haan, S., Burgos, G., Thiele, G., Liria, R., Meisner, C. A., Beebe, S. E., Potts, M. J., Kadian, M., Hobbs, P. R., Gupta, R., & Twomlow, S. (2007). Nutritious subsistence food systems. *Advances in Agronomy*, 92, 1–74.
- Greene, E. R., Huang, S., Serhan, C. H., & Panigrahy, D. (2011). Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prost. Oth. Lip. Mediat*, 96(1-4), 27–36.
- Grimm, H., Mayer, K., Mayser, P., & Eigenbrodt, E. (2002). Regulatory potential of n3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. *Br. J. Nutr.*, 87 (suppl.), 59–67.
- Guamán-Ortiz, L. M., Orellana, M. I. R., & Ratovitski, E. A. (2017). Natural compounds as modulators of non-apoptotic cell death in cancer cells. *Cur. Genomics*, 18, 132–155.
- Guan, Z., Li, S., Lin, Z., Yang, R., Zhao, Y., Liu, J., Yang, S., & Chen, A. (2014). Identification and quantitation of phenolic compounds from the seed and pomace of *Perilla frutescens* using HPLC/PDA and HPLC–ESI/QTOF/MS/MS. *Phytochem. Anal*, 25(6), 508–513.
- Guinazi, M., Milagres, R. C. R. M., Pinheiro-Sant’Ana, H. M., & Chaves, J. B. P. (2009). Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. *Quím. Nova*, 32(8), 2098–2103.
- Guo, D., Zhang, J., Zhu, M., Fan, X., Wu, Y., Liu, A., Yang, M., & Qu, H. (2015). Fingerprint Study. In X. Yan (Ed.), *Dan Shen (Salvia miltiorrhiza) in Medicine*, vol. 2 (357–458): Springer.
- Guo, W., Shu, Y., & Yang, X. (2016). Tea dietary fiber improves serum and hepatic lipid profiles in mice fed a high cholesterol diet. *Plant Foods Hum Nutr*, 71(2), 145–150.
- Hamid, R., Singh, J., Reddy, B. S., & Cohen, L. A. (1999). Inhibition by dietary menhaden oil of cyclooxygenase-1 and -2 in N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumors. *Int J Oncol*, 14, 523–528.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hara, H., Haga, S., Kasai, T., & Kiriya, S. (1998). Fermentation products of sugar-beet fiber by cecal bacteria lower plasma cholesterol concentration in rats. *J Nutr.*, 128(4), 688–693.
- Harris Jackson, K., West, S. G., Vanden Heuvel, J. P., Jonnalagadda, S. S., Ross, A. B., Hill, A. M., Grieger, J. A., Lemieux, S. K., & Kris-Etherton, P. M. (2014). Effects of whole and refined grains in a weight-loss diet on markers of metabolic

- syndrome in individuals with increased waist circumference: a randomized controlled-feeding trial. *Am J Clin Nutrition*, 100, 577–586.
- Hartmann, L., & Lago, R. C. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practices*, 22(8), 475–476.
- Hasima, N., & Ozpolat, B. (2014). Regulation of autophagy by polyphenolic compounds as a potential therapeutic strategy for cancer. *Cell Death Dis.*, 5, e1509.
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds, a review. *F. Chemistry*, 173, 501–513.
- Herrera, M. C., & Luque de Castro, M. D. (2004). Ultrasound-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379(7–8), 1106–1112.
- Ho, H., Lee, A. S., Jovanovski, E., Jenkins, A. L., DeSouza, R., & Vuksan, V. (2013). Effect of whole and ground Salba seeds (*Salvia Hispanica* L.) on postprandial glycemia in healthy volunteers: a randomized controlled, dose-response trial. *Europ. J. of Clin. Nutrition.*, 67, 786–788.
- Hong, Q., Ma, Z.-C., Huang, H., Wang, Y.-G., Tan, H.-L., Xiao, C.-R., Liang, Q.-D., Zhang, H.-T., & Gao, Y. (2016). Antithrombotic activities of ferulic acid via intracellular cyclic nucleotide signaling. *Europ. J. of Pharmacology*, 777, 1–8.
- Hossain, M. B., Raib, D. K., Brunton, N. P., Martin-Diana, A. B., & Barry-Ryan, C. (2010). Characterization of phenolics composition in *Lamiaceae* spices by LC-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chemistry*, 58(19), 10576–10581.
- Hussain, M. M. (2014). Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr. Opin. Lipido.*, 25(3), 200–206.
- IARC (2011). International Agency for Research on Cancer. *Disponível em: <http://www.globocan.iarc.fr>*. [Acesso em: 05 de Maio de 2017].
- Ihara-Watanabe, M., Umekawa, H., Takahashi, T., & Furuichi, Y. (1999). Effects of dietary alpha- or gamma-linolenic acid on levels and fatty acid compositions of serum and hepatic lipids, and activity and mRNA abundance of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in rats. *Comp. Bioch. and Physiology Part A*, 122, 213–220.
- Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature Rev. Mol. Cell Biology*, 9(2), 125–138.
- Il Lee, S., Zuo, X., & Shureiqi, I. (2011). 15-Lipoxygenase-1 as a tumor suppressor gene in colon cancer: is the verdict in? *Cancer Metast. Rev.*, 30(3), 481–491.
- Imamura, K., Noguchi, T., & Tanaka, T. (1986). Markers of human neuroectodermal tumors. *CRC Press, G.E.J. Staal, C.W.M. Van Veelen (Eds.)*, 191–222.
- INCA (2017). Incidência de Câncer no Brasil. *Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: “<http://www.inca.gov.br>”*. [Acesso: 05 de maio de 2017].
- Iñiguez, M. A., Rodriguez Volpert, O. V., Fresno, M., & Redondo, J. M. (2003). Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends Mol Med*, 9(2), 73–78.
- Irakli, M. N., Samanidou, V. F., Biliaderis, C. G., & Papadoyannis, I. N. (2012). Development and validation of an HPLC-method for determination of free and bound phenolic acids in cereals after solid-phase extraction. *F. Chemistry*, 134, 1624–1632.
- Irimie, A. I., Braicu, C., Zanoaga, O., Pileczki, V., Gherman, C., Berindan-Neagoe, I., & Campian, R. S. (2015). Epigallocatechin-3-gallate suppresses cell proliferation and promotes apoptosis and autophagy in oral cancer SSC-4 cells.

- OncoTargets Ther.*, 8, 461–470
- Isken, F., Klaus, S., Osterhoff, M., Pfeiffer, A. F. H., & Weickert, M. O. (2010). Effects of long-term soluble vs. insoluble dietary fiber intake on high-fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *J. of Nutr. Biochemistry*, 21, 278–284.
- Iwamoto, L. H., Vendramini-Costa, D. B., Monteiro, P. A., Ruiz, A. L. T. G., Sousa, I. M. O., Foglio, M. A., Carvalho, J. E., & Rodrigues, R. A. F. (2015). Anticancer and anti-inflammatory activities of a standardized dichloromethane extract from *Piper umbellatum* L. leaves. *Hind. Pub. Corp., Evid.-Based Complem. and Altern. Medicine*, 1–8.
- Ixtaina, V. Y., Julio, L. M., Wagner, J. R., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2015). Physicochemical characterization and stability of chia oil microencapsulated with sodium caseinate and lactose by spray-drying. *Pow. Technology*, 271, 26–34.
- Ixtaina, V. Y., Martínez, M. L., Spotorno, V., Mateo, C. M., Maestri, D. M., Diehl, B. W. K., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2011). Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *J. of Food Comp. and Analysis*, 24, 166–174.
- Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2008). Physical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Ind. Cr. and Products*, 28, 286–293.
- Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2012). Oxidative stability of chia (*Salvia hispanica* L.) seed oil: effect of antioxidants and storage conditions. *J. of the Am. Oil Chemists' Society*, 89(6), 1077–1090.
- Ixtaina, V. Y., Vega, A., Nolasco, S. M., Tomás, M. C., Gimeno, M., Bárzana, E., & Tecante, A. (2010). Supercritical carbon dioxide extraction of oil from Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.): Characterization and process optimization. *J. of Supercritical Fluids*, 55, 192–199.
- Jamra, M. (1941). Histologia, fisiologia e patologia do sistema retículo-endotelial. *Ver. de Medicina*, Agosto, 21–30.
- Jayanthi, G., & Subramanian, S. (2014). Rosmarinic acid, a polyphenol, ameliorates hyperglycemia by regulating the key enzymes of carbohydrate metabolism in high fat diet – STZ induced experimental diabetes mellitus. *Biom and Prev. Nutrition*, 4(3), 431–437.
- Jenkins, D. J. A., Kendall, C. W. C., Marchie, A., Jenkins, A. L., Connelly, P. W., Jones, P. J. H., & Vuksan, V. (2003). The garden of eden-plant based diets, the genetic drive to conserve cholesterol and its implications for heart disease in the 21st century. *Comp. Biochem Physiol*, 136, 141–151.
- Jiang, B., Zhang, L., Li, M., Wu, W., Yang, M., Wang, J., & Guo, D. (2008). Salvianolic acids prevent acute doxorubicin cardiotoxicity in mice through suppression of oxidative stress. *F. and Chem. Toxicology*, 46, 1510–1515.
- Jiménez, F. E. G., Beltrán-Orozco, M. C., & Martínez, M. G. V. (2010). The antioxidant capacity and phenolic content of chia (*Salvia hispanica* L.). integral seed and oil. *Special Abstr. / J. of Biotechnology*, 150S, S315.
- Johnson, J. J. (2011). Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. *Cancer Lett.*, 305(1), 1–7.
- Jong, E. V. (1996). Influência de dietas normo e hiperlipídicas sobre o perfil nutricional, parâmetros bioquímicos séricos e estruturais do fígado de ratos Wistar. *Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Ciência da Nutrição, Campinas*.
- Jorge, N. (2009). Química e tecnologia de óleos vegetais. *Universidade Estadual Paulista, São Paulo*.

- Jump, D. B. (2008). N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr Opin Lipidol.*, 19(3), 242–247.
- Jump, D. B., Botolin, D., Wang, Y., Xu, J., Christian, B., & Demeure, O. (2005). Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *J. Nutrition*, 135, 2503–2506.
- Kabel, A. M., Abdel-Rahman, M. N., El-Sisi, A. E.-D. E., Haleem a, M. S., Ezzat a, N. M., & El Rashidy, M. A. (2013). Effect of atorvastatin and methotrexate on solid Ehrlich tumor. *Europ. J. of Pharmacology*, 713, 47–53.
- Kabel, A. M., Abdel-Rahman, M. N., El-Sisi, A. E.-D. E., Haleem, M. S., Ezzat, N. M., & El Rashidy, M. A. (2013). Effect of atorvastatin and methotrexate on solid Ehrlich tumor. *Europ. J. of Pharmacology*, 713, 47–53.
- Kajihara, M., Okazaki, Y., Kato, S., Ishii, H., Kawakami, Y., Ikeda, Y., & Kuwana, M. (2007). Evaluation of platelet kinetics in patients with liver cirrhosis: similarity to idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Gastroenterol Hepatol.*, 22(1), 112–118.
- Kakkar, S., & Bais, S. (2014). A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. *ISRN Pharmacology*, 2014, 1–9.
- Kamatou, G. P. P., Makunga, N. P., Ramogola, W. P. N., & Viljoen, A. M. (2008). South African *Salvia* species: a review of biological activities and phytochemistry. *J. of Ethnopharmacology*, 119, 664–672.
- Kamatou, G. P. P., Viljoen, A. M., Gono-Bwalya, A. B., van Zyl, R. L., van Vuuren, S. F., Lourens, A. C. U., Baser, K. H. C., Demirci, B., Lindsey, K. L., van Staden, J., & Steenkamp, P. (2005). The in vitro pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species. *J. of Ethnopharmacology*, 102, 382–390.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26, 239–257.
- Key, T. J., Allen, N. E., Spencer, E. A., & Travis, R. C. (2002). The effect of diet on risk of cancer. *Lancet*, 360(9336), 861–868.
- Khalatbari Soltani, S., Jamaluddin, R., Tabibi, H., Mohd Yusof, B. N., Atabak, S., Loh, S. P., & Rahmani, L. (2013). Effects of flaxseed consumption on systemic inflammation and serum lipid profile in hemodialysis patients with lipid abnormalities. *Hemodial Int*, 17, 275–281.
- Khan, M. Z., & He, L. (2017). The role of polyunsaturated fatty acids and GPR40 receptor in brain. *Neuropharmacology*, 113(639–651).
- Kim, H. K., & Choi, H. (2001). Dietary alpha-linolenic acid lowers postprandial lipid levels with increase of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid contents in rat hepatic membrane. *Lipids*, 36, 1331–1336.
- Kim, H. Y., Karanian, J. W., & Salem Jr, N. (1990). Formation of 15-lipoxygenase product from docosahexaenoic acid (22:6- ω 3) by human platelets. *Prostaglandins*, 40(5), 539–549.
- Klaunig, J., & Kamendilus, L. M. (2004). The role of stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.*, 44, 239–267.
- Kontogianni, V. G., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A. A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S., Stojanovic, I., Gerothanassis, I. P., & Tzakos, A. G. (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *F. Chemistry*, 136, 120–129.
- Korekane, H., Nishikawa, A., & Imamura, K. (2003). Mechanisms mediating metabolic abnormalities in the livers of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. *Arch. of*

- Biochem. and Biophysics*, 412, 216–222.
- Korekane, H., Nishikawa, A., & Imamura, K. (2003). Mechanisms mediating metabolic abnormalities in the livers of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 412, 216–222.
- Kozłowska, M., Gruczynska, E., Scibisz, I., & Rudzinska, M. (2016). Fatty acids and sterols composition, and antioxidant activity of oils extracted from plant seeds. *F. Chemistry*, 213, 450–456.
- Kwon, G., Kim, H. J., Park, S. J., Lee, H. E., Woo, H., Ahn, Y. J., Gao, Q., Cheong, J. H., Jang, D. S., & Ryu, J. H. (2014). Anxiolytic-like effect of danshensu [(3-(3,4-dihydroxyphenyl)-lactic acid)] in mice. *Lif. Sciences*, 101, 73–78.
- La Ferla, B., Airolidi, a. C., Zona, C., Orsato, A., Cardona, F., Merlo, S., Sironi, E., D'Orazio, G., & Nicotra, F. (2011). Natural glycoconjugates with antitumor activity. *Nat. Prod. Rep.*, 28, 630–648.
- Lafay, S., & Gil-Izquierdo, A. (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem*, 7, 301–311.
- Lang, F., Qin, Z., Li, F., Zhang, H., Fang, Z., & Hao, E. (2015). Apoptotic cell death induced by resveratrol is partially mediated by the autophagy pathway in human ovarian cancer cells. *Plos One*, 10(6), e0129196.
- Larsson, S. C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M., & Wolk, A. (2004). Dietary long-chain n3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr*, 79, 935–945.
- Le Marchand, L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids, a review. *Biomed Pharmacotherapy*, 56, 296–301.
- Lecomte, J., Giraldo, L. J. L., Laguerre, M., Baréa, B., & Villeneuve, P. (2010). Synthesis, characterization and free radical scavenging properties of rosmarinic acid fatty esters. *J Am Oil Chem Soc*, 87, 615–620.
- Lee, H.-C., Liang, A., Lin, Y.-H., Guo, Y.-R., & Huang, S.-Y. (2017). Low dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio prevents induced oral carcinoma in a hamster pouch model. *Prost., Leuk. and Essential Fatty Acids*.
- Li, J., Gu, T., Fu, X., & Zhao, R. (2015). Effect of salvianolic acid A and C compatibility on inflammatory cytokines in rats with unilateral ureteral obstruction. *J Tradit Chin. Medicine*, 35(5), 564–570.
- Lima, E. S. & Couto, R. D. (2006). Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 42(3), 169–179.
- Lin, K.-Y., Daniel, J. R., & Whistler, R. L. (1994). Structure of chia seed polysaccharide exudate. *Carbohydrate Polymers*, 23(1), 13–18.
- Liu, A.-H.^b, Guo, H., Ye, M., Lin, Y.-H., Sun, J.-H., Xu, M., & Guo, D.-A. (2007). Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *J. of Chromatography A*, 1161, 170–182.
- Liu, M.^a, Li, Y.-G., Zhang, F., Yang, L., Chou, G.-X., Wang, Z.-T., & Hu, Z.-B. (2007). Chromatographic fingerprinting analysis of Danshen root (*Salvia miltiorrhiza* Radix et Rhizoma) and its preparations using high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray mass spectrometry (HPLC-DAESI/MS). *J. Sep. Sci.*, 30, 2256–2267.
- Loeb, W. F., & Quimby, F. W. (1999). The clinical chemistry of laboratory animals. *Clin. Enzymology*, 2 ed., 399–420.
- MacDonald-Wicks, L. K., & Garg, M. L. (2004). Incorporation of n-3 fatty acids into plasma and liver lipids of rats: importance of background dietary fat. *Lipids*,

- 39(6), 545–551.
- Marineli, R. S., Lenquiste, S. A., Moraes, E. A., & Maróstica Jr., M. R. (2015). Antioxidant potential of dietary chia seed and oil (*Salvia hispanica* L.) in diet-induced obese rats. *F. Res. International*, 76, 666–674.
- Marineli, R. S., Moraes, E. A., Lenquiste, S. A., Godoy, A., T., Eberlin, M. N., & Maróstica Jr., M. R. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *LWT- F. Sci. Technol.*, 59, 1304–1310.
- Marineli, R. S., Moura, C. S., Moraes, E. A., Lenquiste, S. A., Lollo, P. C. B., Morato, P. N., Amaya-Farfan, J., & Maróstica Jr., M. R. (2015). Chia (*Salvia hispanica* L.) enhances HSP, PGC-1 α expressions and improves glucose tolerance in diet-induced obese rats. *Nutrition*, 31, 740–748.
- Marnette, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21, 361–370.
- Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Reboul, P., & Pelletier, J. P. (2003). Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Rheum Dis*, 62(6), 501–509.
- Martin, C. A., Almeida, V. V., Ruiz, M. R., Visentainer, J. E. L., Matshushita, M., Nilson Evelázio de Souza, N. E., & Visentainer, J. V. (2006). Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev. Nutr., Campinas*, 19(6), 761–770.
- Martínez-Cruz, O., & Paredes-López, O. (2014). Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) by ultra high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1346, 43–48.
- Martínez, M. L., Curti, M. I., Roccia, P., Llabot, J. M., Penci, M. C., Bodoira, R. M., & Ribotta, P. D. (2015). Oxidative stability of walnut (*Juglans regia* L.) and chia (*Salvia hispanica* L.) oils microencapsulated by spray drying. *Powder Technology*, 270, 271–277.
- Martínez, M. L., Marín, M. A., Faller, C. M. S., Revol, J., Penci, M. C., & Ribotta, P. D. (2012). Chia (*Salvia hispanica* L.) oil extraction: study of processing parameters. *F. Sci. and Technology*, 47, 78–82.
- Martins, N., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: facts and gaps. *Tr. in F. Sci. & Technology*, 48, 1–12.
- Masana, M. F., Koyanagi, A., Haro, J. M., & Tyrovolas, S. (2017). n-3 Fatty acids, Mediterranean diet and cognitive function in normal aging: a systematic review. *Exper. Gerontology*, 91, 39–50.
- Messamore, E., Almeida, D. M., Jandacek, R. J., & McNamara, R. K. (2017). Polyunsaturated fatty acids and recurrent mood disorders: phenomenology, mechanisms, and clinical application. *Prog. in Lip. Research*, 66, 1–13.
- Miccadei, S., Masella, R., Mileo, A. M., & Gessani, S. (2016). ω 3 Polyunsaturated fatty acids as immunomodulators in colorectal cancer: new potential role in adjuvant therapies. *Front. in Immunology*, 7, 486.
- Miettinen, T. A., & Gylling, H. (1999). Regulation of cholesterol metabolism by dietary plant sterols. *Curr. Opin. Lipidol.*, 10, 9–14.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharm. Reviews*, 56(2), 185–229.
- Miranda-Vilela, A. L., Grisolia, C. K., Longo, J. P. F., Peixoto, R. C. A., Almeida, M. C., Barbosa, L. C. P., Roll, M. M., Portilho, F. A., Estevanato, L. L. C., Bocca, A. L., Bão, S. N., & Lacava, Z. G. M. (2014). Oil rich in carotenoids instead of vitamins C and E as a better option to reduce doxorubicin-induced damage to

- normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice: hematological, toxicological and histopathological evaluations. *J. of Nutr. Biochemistry*, 25, 1161–1176.
- Mohd Ali, N., Yeap, S. K., Ho, W. Y., Beh, B. K., Tan, S. W., & Tan, S. G. (2012). The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. *J. of Biom. and Biotechnology*, 2012, 1–9.
- Monteiro, L. S., Bastos, K. X., Barbosa-Filho, J. M., Athayde-Filho, P. F., Diniz, M. F. F. M., & Sobral, M. V. (2014). Medicinal plants and other living organisms with antitumor potential against lung cancer. *Ev.-Bas. Complem. and Alter. Medicine, ID 604152*, 15.
- Moretto, E., & Fett, R. (1998). Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos. *São Paulo: Varela*, 150.
- Morrison, I. M. (1980). Changes in the lignin and hemicellulose concentrations of ten varieties of temperate grasses with increasing maturity. *Grass Forage Sci.*, 35, 287–293.
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Bátakai, S., Kashiwaya, Y., Haskó, G., Liaudet, L., Szabó, C., & Pacher, P. (2009). Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 296, H1466–H1483.
- Muñoz, L. A., Cobos, A., Diaz, O., & Aguilera, J. M. (2012). Chia seeds: microstructure, mucilage extraction and hydration. *J. of Food Engineering*, 108(1), 216–224.
- Murase, T., Aoki, M., & Tokimitsu, M. (2005). Supplementation with α -linolenic acid-rich diacylglycerol suppresses fatty liver formation accompanied by an up-regulation of β -oxidation in Zucker fatty rats. *Biochimica et Biophys Acta (BBA)-Molecular and Cell Biol of lipids*, 1733(2-3), 224–231.
- Naczek, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J. of Pharm. and Biom. Analysis*, 41, 1523–1542.
- Nakamura, M. T., Yudell, B. E., & Loor, J. J. (2014). Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 53, 124–144.
- Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., & Scaccini, C. (2002). Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption, *J. of Agric. and Food Chemistry*, 50, 5735–5741.
- Nardini, M., & Ghiselli, A. (2004). Determination of free and bound phenolic acids in beer. *F. Chemistry*, 84(1), 137–143.
- Nascimento, F. R., Cruz, G. V., Pereira, P. V., Maciel, M. C., Silva, L. A., Azevedo, A. P. S., Barroqueiro, E. S. B., & Guerra, R. N. M. (2006). Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Lif. Sci.*, 78(22), 2650–2653.
- Nasr Bouzaiene, N., Jaziri, S. K., Kovacic, H., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., & Luis, J. (2015). The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. *Eur. J. of Pharmacology*, 766, 99–105.
- NCI (2017). National Cancer Institute. Disponível em: <https://www.cancer.gov/>. [Acesso em 05 de maio de 2017].
- Ndolo, V. U., & Beta, T. (2013). Distribution of carotenoids in endosperm, germ, and aleurone fractions of cereal grain kernels. *F. Chemistry*, 139, 663–671.
- Nuengchamnong, N., Krittasilp, K., & Ingkaninan, K. (2011). Characterisation of phenolic antioxidants in aqueous extract of *Orthosiphon grandiflorus* tea by LC-ESI-MS/MS coupled to DPPH assay. *F. Chemistry*, 127, 1287–1293.
- Nystrom, L., Paasonen, A., Lampi, A.-M., & Piironen, V. (2007). Total plant sterols,

- steryl ferulates and steryl glycosides in milling fractions of wheat and rye. *J. of Cer. Science*, 45, 106–115.
- O'Connell, T. D., Block, R. C., Huang, S. P., & Shearer, G. C. (2017). ω 3-Polyunsaturated fatty acids for heart failure: effects of dose on efficacy and novel signaling through free fatty acid receptor 4. *J. of Mol. and Cel. Cardiology*, 103, 74–92.
- Oak, M. H., El Bedoui, J., & Schini-Kerth, V. B. (2005). Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. *J. of Nutr. Biochemistry*, 16, 1–8.
- Oates, J. A., Fitzgerald, G. A., Branch, R. A., Jackson, E. K., Knapp, H. R., & Roberts, L. J. (1988). Clinical implications of prostaglandin and thromboxane A2 formation. *N. Engl. J. Med.*, 319, 689–698.
- OECD. (2002). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. *OECD Publishing*.
- Okada, H., & Mak, T. W. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. *Nature rev.*, 4, 592–603.
- Oliveira-Alves, S. C., Vendramini-Costa, D. B., Cazarin, C. B. B., Maróstica Jr., M. R., Ferreira, J. P. B., Silva, A. B., Prado, M. A., & Bronze, M. R. (2017). Characterization of phenolic compounds in chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, fiber flour and oil. *F. Chemistry*, 232, 295–305.
- Oliveira, D. M., & Bastos, D. H. M. (2011). Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Quim. Nova*, 34(6), 1051–1056.
- Oloris, S. C. S., Dagli, M. L. Z., & Guerra, J. L. (2002). Effect of h-carotene on the development of the solid Ehrlich tumor in mice. *Lif. Sciences*, 71, 717–724.
- Ou, B., Chang, T., Huang, D., & Prior, R. L. (2013). Determination of total antioxidant capacity by oxygen radical 563 absorbance capacity (ORAC) using fluorescein as the fluorescence probe: first action 2012.23. *J. of 564 AOAC International*, 96(6), 1372–1376.
- Oyedemi, S. O., Adewusi, E. A., Aiyegoro, O. A., & Akinpelu, A. D. (2011). Antidiabetic and haematological effect of aqueous extract of stem bark of *Azelia africana* (Smith) on streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Asian Pac. J. of Trop. Biomedicine*, 1(5), 353–358.
- Ozaslan, M., Karagoz, I. D., Kilic, I. H., & Guldur, M. E. (2011). Ehrlich ascites carcinoma. *African J. of Biotechnology*, 10(13), 2375–2378.
- Pidgeon G. P., Kandouz, M., Meram, A. & Honn, K. V. (2002). Mechanisms controlling cell cycle arrest and induction of apoptosis after 12-lipoxygenase inhibition in prostate cancer cells. *Cancer Res.*, 62, 2721–2727.
- Parejo, I., Caprai, E., Bastida, J., Viladomat, F., Jáuregui, O., & Codina, C. (2004). Investigation of *Lepechinia graveolens* for its antioxidant activity and phenolic composition. *J. of Ethnopharmacology*, 94, 175–184.
- Peiretti, P. G., & Gai, F. (2009). Fatty acid and nutritive quality of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds and plant during growth. *Anim. Feed Sci. and Technology*, 148 267–275.
- Pelletier, X., Belbraouet, S., Mirabel, D., Mordret, F., Perrin, J. L., Pages, X., & Debry, A. (1995). A diet moderately enriched in phytosterols lowers plasma cholesterol concentrations in normocholesterolemic humans. *Ann. Nutr. Metab.*, 39, 291–295.
- Perini, J. A. L., Stevanato, F. B., Sargi, S. C., Visentainer, J. E. L., Dalalio, M. M. O., Matshushita, M., Souza, N. E., & Visentainer, J. V. (2010). Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. *Rev. Nutr.*,

- 23(6), 1075–1086.
- Perry, R. J., Samuel, V. T., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2014). The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 510(5), 84–91.
- Phillips, K. M., Ruggio, D. M., Toivo, J. I., Swank, M. A., & Simpkins, A. H. (2002). Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. *J. of F. Comp. and Analysis*, 15, 123–142.
- Pitot, H. C., Iwasaki, Y., Inoue, H., Kasper, C., & Mohrenweiser-Gann, H. (1972). Regulation of the levels of multiple forms of serine dehydratase and tyrosine aminotransferase in rat tissues. *Cancer Res.*, 13, 191–204.
- Pizarro, M. L., Becerra, M., Sayago, A., Beltrán, M., & Beltrán, R. (2013). Comparison of different extraction methods to determine phenolic compounds in virgin olive oil. *Food Anal. Methods*, 6, 123–132.
- Porrás-Loaiza, P., Jiménez-Munguía, M. T., Sosa-Morales, M. E., Palou, E., & Lopez-Malo, A. (2014). Physical properties, chemical characterization and fatty acid composition of Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Inter. J. of Food Sci. and Technology*, 49, 571–577.
- Poudyal, H., Panchal, S. K., Waanders, J., Ward, L., & Brown, L. (2012). Lipid redistribution by alpha-linolenic acid-rich chia seed inhibits stearyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. *J. of Nutr. Biochemistry*, 23, 153–162.
- Pradhananga, S., & Shim, W. S. (2015). Caffeic acid exhibits anti-pruritic effects by inhibition of multiple itch transmission pathways in mice. *Eur. J. of Pharmacology*, 762, 313–321.
- Prado, M. A., Lizama, M., Pena, A., Valenzuela, C., & Viviani, T. (2008). Short duration of initial intravenous treatment in 70 pediatric patients with osteoarticular infections. *Ver. Chil. De Infectologia*, 25(1), 30–36.
- Prasad, S., Gupta, S. C., Pandey, M. K., Tyagi, A. K., & Deb, L. (2016). Oxidative stress and cancer: advances and challenges. *Oxid. Med. and Cel. Longevity*, 2016, ID 5010423.
- Prasad, S., Gupta, S. C., & Tyagi, A. K. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters*, 387, 95–105.
- Prior, R. L. (2015). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): new horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J. of Fun. Foods*, 18, 797–810.
- Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., & Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chemistry*, 51, 3273–3279.
- Ragaei, S., Abdel-Aal, M. E.-S., & Noaman, M. (2006). Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *F. Chemistry*, 98, 32–38.
- Rasband WS. ImageJ, U.S (2012). National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, imagej.nih.gov/ij/, 1997–2012.
- Rebellato, A. P., Pacheco, B. C., Prado, J. P., & Pallone, J. A. L. (2015). Iron in fortified biscuits: a simple method for its quantification, bioaccessibility study and physicochemical quality. *Food Res. International*, 77, 385–391.
- Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Valli, E., Bendini, A., Toschi, T. G., & Simal-Gandara, J. (2016). Characterization of virgin olive oils produced with autochthonous Galician varieties. *F. Chemistry*, 212, 162–171.

- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey Jr., G. C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 A rodent diet. *Journal of Nutrition*, 123, 1939–1951.
- Reflotron. (2010). Manual de Instruções da Roche Diagnostics. *Roche Diagnostics*.
- Renaud, H. J., Cui, J. Y., Lu, H., & Klaassen, C. D. (2014). Effect of diet on expression of genes involved in lipid metabolism, oxidative stress, and inflammation in mouse liver—insights into mechanisms of hepatic steatosis. *Plos One*, 9 (2), e88584.
- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., & Valdivia-López, M. A. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *F. Chemistry*, 107, 656–663.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Fr. Rad. Biol. & Medicine*, 20(7), 933–956.
- Richards, L. B., Li, M., van Esch, B. C. A. M., Garssen, J., & Folkerts, G. (2016). The effects of short-chain fatty acids on the cardiovascular system. *PharmaNutrition*, 4, 68–111.
- Richardson, D. S., & Johnson, S. A. (1997). Anthracyclines in haematology: preclinical studies, toxicity and delivery systems. *Bl. Reviews*, 11, 201–223.
- Rincón-Cervera, M. A., Valenzuela, R., Hernandez-Rodas, M. C., Barrera, C., Espinosa, A., Marambio, M., & Valenzuela, A. (2016). Vegetable oils rich in alpha linolenic acid increment hepatic n-3 LCPUFA, modulating the fatty acid metabolism and antioxidant response in rats. *Prost., Leuk. and Essential Fatty Acids*, 111, 25–35.
- Rios, H. C. S., Pereira, I. R. O., & Abreu, E. S. (2013). Avaliação da oxidação de óleos, gorduras e azeites comestíveis em processo de fritura. *Rev. Ci. & Saúde*, 6(2), 118–126.
- Rocha, J., Eduardo-Figueira, M., Barateiro, A., Fernandes, A., Brites, D., Bronze, M. R., Duarte, C. M. M., Serra, A. T., Pinto, R., Freitas, M., Fernandes, E., Silva-Lima, B., Mota-Filipe, H., & Sepodes, B. (2015). Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and an extract of *Rosmarinus officinalis* in rat models of local and systemic inflammation. *Bas. & Clin. Pharm. & Toxicology*, 116, 398–413.
- Rodriguez, D. B., Raymundo, L. C., Lee, T.-C., Simpson, K. L., & Chichester, C. O. (1976). Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. *Annals of Botany, Rome.*, 40, 615–624.
- Roleira, F. M. F., Tavares-da-Silva, E. J., Varela, C. L., Costa, S. C., Silva, T., Garrido, J., & Borges, F. (2015). Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties. *F. Chemistry*, 183, 235–258.
- Rose, D. P., & Connolly, J. M. (1999). Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents *Pharm. & Therapeutics*, 83, 217–244.
- Ruan, M., Li, Y., Li, X., Luo, J., & Kong, L. (2012). Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Chinese medicinal preparation Guan-Xin-Ning injection by HPLC–DAD–ESI-MSⁿ. *J. of Pharm. and Biom. Analysis*, 59, 184–189.
- Rubió, L., Motilva, M.-J., Macià, A., Ramo, T., & Romero, M.-P. (2012). Development of a phenol-enriched olive oil with both its own phenolic compounds and complementary phenols from thyme. *J. Agric. Food Chemistry*, 60, 3105–3112.
- Ruiz-Núñez, B., Dijck-Brouwer, D. A. J., & Muskiet, F. A. J. (2016). The relation of saturated fatty acids with low-grade inflammation and cardiovascular disease. *J.*

- of *Nutr. Biochemistry*, 36, 1–20.
- Rupollo, G., Gutkoski, L. C., Martins, I. R., & Elias, M. C. (2006). Efeito da umidade e do período de armazenamento hermético na contaminação natural por fungos e a produção de micotoxinas em grãos de aveia. *Ciênc. Agrotec.*, 30(1), 118–125.
- Saavedra-García, P., Nichols, K., Mahmud, Z., Yuen-Nam Fan, L., & Lam, E. W.-F. (2017). Unravelling the role of fatty acid metabolism in cancer through the FOXO3-FOXM1 axis. *Mol. and Cel. Endocrinology*, 1–11.
- Sánchez-Rabaneda, F., Jáuregui, O., Casals, I., Andrés-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., & Lamuela-Raventós, R. M. (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *J. Mass Spectrometry*, 38, 35–42.
- Sandoval-Oliveros, M. R., & Paredes-López, O. (2013). Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salviahispanica* L.). *J. Agric. F. Chemistry*, 61, 193–201.
- Sanitária, B. A.-A. N. d. V. (1978). Resolução - CNNPA nº 12 , Padrões de identidade e qualidade para os alimentos e bebidas.
- Sanitária, B. A.-A. N. d. V. (2003). RDC 360 - Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. *D. Of. da Rep. Fed. do Brasil*.
- Sargi, S. C., Silva, B. C., Santos, H. M. C., Montanher, P. F., Boeing, J. S., Santos Jr., O. O., Souza, N. E., & Visentainer, J. V. (2013). Antioxidant capacity and chemical composition in seeds rich in omega-3: chia, flax, and perilla. *F. Sci. and Technology*, 33(3), 541–548.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. of Nutrition*, 130, 2073S–2085S.
- Segura-Campos, M. R., Salazar-Vega, M. I., Chel-Guerrero, L. A., & Betancur-Ancona, D. A. (2013). Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods *F. Sci. and Technology*, 50(2), 723–731.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects – a review. *J. of Fun. Foods, Volume 18*(Part B), 820–897.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *J. of Fun.l Foods*, 18, 757–781.
- Shanmugam, M. K., Lee, J. H., Chai, E. Z. P., Kanchi, M. M., Kar, S., Arfuso, F., Dharmarajan, A., Kumar, A. P., Ramar, P. S., Looi, C. Y., Mustafa, M. R., Tergaonkar, V., Bishayee, A., Ahn, K. S., & Sethi, G. (2016). Cancer prevention and therapy through the modulation of transcription factors by bioactive natural compounds. *Sem. in Cancer Biology*, 40-41, 35–47.
- Sherlock, S. (1985). Diseases of the Liver and Biliary System. 7^a ed. Oxford: Blackwell, 1–59.
- Shi, Y. Y., Zhao, H. M., & Wu, C. X. (1993). Relative binding free energy calculations of DNA to daunomycin and its 13-dihydro analogue. *Int. J. Biol. Macromol.*, 15, 247–251.
- Shim, Y. Y., Gui, B., Wang, Y., & Reaney, M. J. T. (2015). Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil processing and selected products. *Tr. in Food Sci. & Technology*, 43, 162–177.
- Shobha, R. I., & Andallu, B. (2013). Oxidative stress and cancer: role of anti-carcinogenic herbs and spices. *Am. J. of Phytom. and Clin. Therapeutics*, 3, 351–369.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*,

- 66(1), 7–30.
- Silva, B. P., Anunciação, P. C., Matyelka, J. C. S., Lucia, C. M. D., Martino, H. S. D., & Pinheiro-Sant’Ana, H. M. (2017). Chemical composition of Brazilian chia seeds grown in different places. *F. Chemistry*, 221 1709–1716.
- Silva, L., Pinto, J., Carrola, J., & Paiva-Martins, F. (2010). Oxidative stability of olive oil after food processing and comparison with other vegetable oils. *F. Chemistry*, 121, 1177–1187.
- Simopoulos, A. P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med.(Maywood)*, 233(6), 674–688.
- Singh, J., Hamid, R., & Reddy, B. S. (1997). Dietary fat and colon cancer: modulation of cyclooxygenase-2 by types and amount of dietary fat during the postinitiation stage of colon carcinogenesis. *Cancer Res*, 57, 3465–3470.
- Sinnhuber, R. O., & Yu, T. C. (1958). 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. II. The quantitative determination of malonaldehyde. *F. Technology*, 12, 9–12.
- Sivaprakasam, S., Prasad, P. D., & Singh, N. (2016). Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. *Pharm. & Therapeutics*, 164, 144–151.
- Soeiro, B. T., Boen, T. R. , Pereira-Filho, E. R. & Lima-Pallone, J. A. (2010). Investigação da qualidade de farinhas enriquecidas utilizando Análise por Componentes Principais (PCA). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 30 (3), 618–624.
- Souza, N. E., & Visentainer, J. V. (2012). Colesterol da mesa ao corpo. *Eduem*, 2 ed., Maringá, 27–28.
- Sozen, E., & Ozer, N. K. (2017). Impact of high cholesterol and endoplasmic reticulum stress on metabolic diseases: an updated mini-review. *Red. Biology*, 12, 456–461.
- Spencer, J. P., Abd, E. I., Mohsen, M. M., Minihaane, A. M., & Mathers, J. C. (2008). Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *Br. J. Nutr.*, 99, 12–22.
- Spínola, V., Pinto, J., & Castilho, P. C. (2015). Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD–ESI-MSⁿ and screening for their antioxidant activity. *F. Chemistry*, 173, 14–30.
- Stewart, B. W., & Wild, C. P. ((2014)). World cancer report (WHO). *Disponível em: <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>. [Acesso em: 01 de fevereiro de 2017]*.
- Subramani, S., Gajendren, S., Mahadevan, J., Jayachandran, M., Udaiyar, M., & Vinayagam, R. (2014). Ameliorating effect of eugenol on hyperglycemia by attenuating the key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem*, 385, 159–168.
- Swain, T., & Hillis, W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. — The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. of the Sci. of Food and Agriculture*, 10(1), 63–68.
- Tacar, O., Sriamornsak, P., & Dass, C. R. (2013). Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J. of Pharm. and Pharmacology*, 65, 157–170.
- Takashima, A., Fukuda, D., Tanaka, K., Higashikuni, Y., Hirata, Y., Nishimoto, S., Yagi, S., Yamada, H., Soeki, T., Wakatsuki, T., Taketani, Y., Shimabukuro, M., & Sata, M. (2016). Combination of n-3 polyunsaturated fatty acids reduces atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice by inhibiting macrophage

- activation. *Atherosclerosis*, 254, 142–150.
- Talmadge, J. E., & Gabrilovich, D. I. (2013). History of myeloid derived suppressor cell (MDSCs) in the macro- and micro-environment of tumour-bearing hosts. *Nature Rev. Cancer*, 13(10), 739–752.
- Tang, S., Bhatia, B., Maldonado, C. J., Yang, P., Newman, R. A., Liu, J., Chandra, D., Traag, J., Klein, R. D., Fischer, S. M., Chopra, D., Shen, J., Zhau, H. E., Chung, L. W. K., & Tang, D. G. (2002). Evidence that arachidonate 15-lipoxygenase 2 is a negative cell cycle regulator in normal prostate epithelial cells. *J Biol chem*, 277, 16189–16201.
- Tang, Y., Wang, M., Le, X., Meng, J., Huang, L., Yu, P., Chen, J., & Wu, P. (2011). Antioxidant and cardioprotective effects of Danshensu (3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxy-propanoic acid from *Salvia miltiorrhiza*) on isoproterenol-induced myocardial hypertrophy in rats. *Phytomedicine*, 18, 1024–1030.
- Tasioula-Margari, M., & Tsabolatidou, E. (2015). Extraction, separation, and identification of phenolic compounds in virgin olive oil by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Antioxidants*, 4, 548–562.
- Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., & Altmana, R. B. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet. Genomics*, 21, 440–446.
- Thrall, M. A. (2007). Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. *Editora Roca*, 1ª edição, 688.
- Timilsena, Y. P., Wang, B., Adhikari, R., & Adhikari, B. (2017). Advances in microencapsulation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs)-rich plant oils using complex coacervation: A review. *F. Hydrocolloids*, 69, 369–381.
- Tokudome, S., Kuriki, K., Yokoyama, Y., Sasaki, M., Joh, T., Kamiya, T., Cheng, J., Ogawa, K., Shirai, T., N., I., Goto, C., Tokudome, Y., Ichikawa, H., & Okuyama, H. (2015). Dietary n-3/long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids for prevention of sporadic colorectal tumors: a randomized controlled trial in polypectomized participants. *Prost., Leuk. and Essential FattyAcids*, 94, 1–11.
- Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2016). Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update. *Cancer Epidemiol Biom. Prev.*, 25(1).
- Tosco, G. (2004). Os Benefícios da “Chia” em Humanos e Animais. *Atualidades Ornitológicas*, 119, 7.
- Trivellini, A., Lucchesini, M., Maggini, R., Mosadegh, H., Villamarin, T. S. S., Vernieri, P., Mensuali-Sodia, A., & Pardossi, A. (2016). *Lamiaceae* phenols as multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of “positive-stress”. *Ind. Cr. and Products*, 83, 241–254.
- Tsimidou, M. Z., Nenadis, N., & Mastralexi, A. (2014). Addressing analytical requirements to support health claims on "olive oil polyphenols" (EC Regulation 432/2012). *J. of Agr. and Food Chemistry*, 62, 2459–2461.
- Tsutsumi, S., Haruna, R., Tomisato, W., Takano, T., Hoshino, T., Tsuchiya, T., & Mizushima, T. (2002). Effects of prostaglandins on spontaneous apoptosis in gastric mucosal cells. *Dig. Dis. and Sciences*, 47, 84–89.
- Tuberoso, C. I. G., Kowalczyk, A., Sarritzu, E., & Cabra, P. (2007). Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *F. Chemistry*, 103, 1494–1501.
- Valadares, M. C. (2006). Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. *Rev. Eletr. de Farmácia*, 3(2), 93–98.

- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Christopher, J., Rhodes, C., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell Biochem.*, 266, 37–56.
- Vendramini-Costa, D. B., & Carvalho, J. E. (2012). Molecular Link Mechanisms between Inflammation and Cancer. *Cur Pharm. Design*, 18, 3831–3852.
- Vendramini-Costa, D. B., Castro, I. B. D., Ruiz, A. L. T. G., Marquissolo, C., Pilli, R. A., & Carvalho, J. E. (2010). Effect of goniotalamin on the development of Ehrlich solid tumor in mice. *Bioorg. & Med. Chemistry*, 18, 6742–6747.
- Vendramini-Costa, D. B., Francescone, R., Posocco, D., Hou, V., Dmitrieva, O., Hensley, H., Carvalho, J. E., Pilli, R. A., & Grivennikov, S. I. (2017). Anti-inflammatory natural product goniotalamin reduces colitis-associated and sporadic colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 38(1), 51–63.
- Verçosa Júnior, D., Souza-Fagundes, E. M., Cassali, G. D., Ribeiro, E. L., Zani, C. L., & Melo, M. M. (2006). Efeito do miriadenolídeo isolado de *Alomia myriadenia* (Asteraceae) sobre o tumor de Erlich ascítico no camundongo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58(5), 788–798.
- Verçosa Júnior, D., Souza-Fagundes, E. M., Cassali, G. D., Ribeiro, E. L., Zani, C. L., & Melo, M. M. (2006). Efeito do miriadenolídeo isolado de *Alomia myriadenia* (Asteraceae) sobre o tumor de Erlich ascítico no camundongo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58(5), 788–798.
- Wang, C., Peng, R., Wang, L., Chen, P., Wang, S., Xu, X., Zhang, Q., Lin, S., & Hu, X. (2014). *Wushen*, a food mixture containing 55 different natural ingredients, inhibits S180 tumor growth *in vivo*. *Food Funct.*, 5, 1475–1480.
- Wang, D., & Dubois, R. N. (2010). Eicosanoids and cancer *Nat Rev Cancer*, 10(3), 181–193.
- Wang, G., Zhang, J., Liu, L., Sharma, S., & Dong, Q. (2012). Quercetin potentiates doxorubicin mediated antitumor effects against liver cancer through p53/Bcl-xl. *Plos One*, 7(12), e51764.
- Wang H, Yin Y, Wang P, Xiong C, Huang L, Li S, Li X, & L., F. (2016). Current situation and future usage of anticancer drug databases. *Apoptosis*, 21(7), 778–794.
- Wang^a, T., He, F., & Chen, G. (2014). Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review. *J. of Foods*, 7, 101–111.
- Wang, W., Zhu, J., Lyua, F., Panigrahy, D., Ferrara, K. W., Hammock, B., & Zhang, G. (2014). ω -3 Polyunsaturated fatty acids-derived lipid metabolites on angiogenesis, inflammation and cancer. *Prost. & oth. Lip. Mediators*, 113–115, 13–20.
- Weickert, M. O., & Pfeiffer, F. H. A. (2008). Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. *J. of Nutrition*, 138(3), 439–442.
- Welch, A. A., Shakya-Shrestha, S., Lentjes, M. A. H., Wareham, N. J., & Khaw, K.-T. (2010). Dietary intake and status of n-3 polyunsaturated fatty acids in a population of fish-eating and non-fish-eating meat eaters, vegetarians, and vegans and the product-precursor ratio [corrected] of α -linolenic acid to long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids: results from the EPIC-Norfolk cohort. *Am. J. Clin. Nutr.*, 92, 1040–1051.
- Weng, C.-J., & Yen, G.-C. (2012). Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treatm. Reviews*, 38, 76–87.
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2009). Biofortification of crops with seven mineral

- elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, 182, 49–84.
- Wiesenfeld, P. W., Babu, U. S., Collins, T. F. X., Sprando, R., O'Donnell, M. W., Flynn, T. J., Black, T., & Olejnik, N. (2003). Flaxseed increased α -linolenic and eicosapentaenoic acid and decreased arachidonic acid in serum and tissues of rat dams and offspring. *Food and Chem. Toxicology*, 41, 841–855.
- Willem van der Kamp, J., Jones, J., McCleary, B., & Topping, D. (2010). Dietary fibre: new frontiers for food and health. *Wageningen Acad. Publishers*.
- Wilson, J. R., Deinum, B., & Engels, F. M. (1991). Temperature effects on anatomy and digestibility of leaf and stem of tropical and temperate forage species. *Neth. J. Agric. Sci.*, 39, 31–48.
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, & LA., L. (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.*, 14, 437–486.
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T., & Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.*, 21, 381–406.
- Yang, S.-Y., Hong, C.-O., Lee, G. P., Kim, C.-T., & Lee, K.-W. (2013). The hepatoprotection of caffeic acid and rosmarinic acid, major compounds of *Perilla frutescens*, against t-BHP-induced oxidative liver damage. *Food and Chem. Toxicology*, 55, 92–99.
- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Pl. F. for Hum. Nutrition*, 59, 113–122.
- Zeng, G., Xiao, H., Liu, J., & Liang, X. (2006). Identification of phenolic constituents in *Radix Salvia miltiorrhizae* by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rap. Commun. Mass Spectrometry*, 20, 499–506.
- Zhang, G., Panigrahy, D., Mahakian, L. M., Yang, J., Liu, J.-Y., Lee, K. S. S., Wettersten, H. I., Ulu, A., Hu, X., Tam, S., Hwang, S. H., Ingham, E. S., Kieran, M. W., Weiss, R. H., Ferrara, K. W., & Hammock, B. D. (2013). Epoxy metabolites of docosahexaenoic acid (DHA) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis. *PNAS*, 110(16), 6530–6535.
- Zhang, Y., Yan, Y.-P., Wu, Y.-C., Hua, W.-P., Chen, C., Ge, Q., & Wang, Z.-Z. (2014). Pathway engineering for phenolic acid accumulations in *Salvia miltiorrhiza* by combinational genetic manipulation. *Metabolic Engineering*, 21, 71–80.
- Zhang, Y., Smuts, J. P., Dodbiba, E., Rangarajan, R., Lang, J. C., & Armstrong, D. W. (2012). Degradation Study of Carnosic Acid, Carnosol, Rosmarinic Acid, and Rosemary Extract (*Rosmarinus officinalis* L.) Assessed Using HPLC. *J. Agric. Food Chemistry*, 60, 9305–9314.
- Zhao, G.-R., Zhang, H.-M., Ye, T.-X., Xiang, Z.-J., Yuan, Y.-J., Guo, Z.-X., & Zhao, L.-B. (2008). Characterization of the radical scavenging and antioxidant activities of danshensu and salvianolic acid B. *F. and Chem. Toxicology*, 46, 73–81.
- Zhao, G., Etherton, T. D., Martin, K. R., West, S. G., Gillies, P. J., & Kris-Etherton, P. M. (2004). Dietary α -linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. *J Nutr.*, 134, 2991–2997.
- Zhu, Z., Zhang, H., Zhao, L., Dong, X., Li, X., Chai, Y., & Zhang, G. (2007). Rapid separation and identification of phenolic and diterpenoid constituents from *Radix Salvia miltiorrhizae* by high-performance liquid chromatography diode-array detection, electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry and

- electrospray ionization quadrupole ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, 21, 1855–1865.
- Ziboh, V. A., Miller, C. C., & Cho, Y. (2000). Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. *Am J Clin Nutr*, 71(1 Suppl.), 361s–366s.
- Ziech, D., Franco, R., Georgkalikas, A. G., Georgakila, S., Malamou-Mitsi, V., Schoneveld, O., Pappa, A., & Panayiotidis, M. I. (2010). The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chem Biol Interact*, 188, 334–339.

ANEXO 1



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp****CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto "Atividade antitumoral do óleo de chia e extrato aquoso de farinha de chia" (protocolo nº 3192-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado / Sheila Cristina De Oliveira Alves, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 07 de outubro de 2013.

Campinas, 07 de outubro de 2013.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO 2



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação de Toxicidade Aguda do óleo e farinha de chia" (protocolo nº 3194-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado / Sheila Cristina De Oliveira Alves, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 07 de outubro de 2013.

Campinas, 07 de outubro de 2013.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO 3

Composição centesimal da ração comercial utilizada na alimentação dos animais durante o ensaio biológico de toxicidade aguda do óleo de chia (Capítulo III).

Composição centesimal da ração comercial Marca BioBase

Componentes (g/100g ração)	BioBase
Proteína	17,05 ± 0,92
Lipídeos	6,45 ± 0,05
Cinzas	8,13 ± 0,17
Umidade	9,71 ± 0,01
Carboidratos ^a	58,64
Energia (Kcal/100g) ^b	362,61 ± 0,29

^a Cálculo por diferença: (carboidratos = 100 - (umidade + cinzas + proteínas + lipídeos)).

^b Valor de energia é expresso em Kcal/100g (Fator de Atwater).

ANEXO 4

2017-6-22

RightsLink Printable License

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jun 22, 2017

This Agreement between Mrs. Sheila Cristina Oliveira Alves ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4134160722365
License date	Jun 22, 2017
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Food Chemistry
Licensed Content Title	Characterization of phenolic compounds in chia (<i>Salvia hispanica</i> L.) seeds, fiber flour and oil
Licensed Content Author	Sheila Cristina Oliveira-Alves, Débora Barbosa Vendramini-Costa, Cinthia Baú Betim Cazarin, Mário Roberto Maróstica Júnior, João Pedro Borges Ferreira, Andreia Bento Silva, Marcelo Alexandre Prado, Maria Rosário Bronze
Licensed Content Date	Oct 1, 2017
Licensed Content Volume	232
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	11
Start Page	295
End Page	305
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Order reference number	
Title of your thesis/dissertation	Evaluation of antioxidant, hypocholesterolemic and antitumoral effects of the chia seed and oil
Expected completion date	Jul 2017
Estimated size (number of pages)	230
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Mrs. Sheila Cristina Oliveira Alves Rua Monteiro Lobato, 80 Cidade Universitária Campinas, São Paulo 13083-862 Brazil Attn: Mrs. Sheila Cristina Oliveira Alves