

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E NUTRIÇÃO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA NUTRIÇÃO
ÁREA DE NUTRIÇÃO BÁSICA E EXPERIMENTAL

AÇÃO ANTIOXIDANTE DA VITAMINA E SOBRE A OXIDAÇÃO
LIPÍDICA SÉRICA E HEPÁTICA DE RATOS WISTAR
SUPLEMENTADOS COM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS
ÔMEGA-3

FLÁVIA QUEIROGA ARANHA DE ALMEIDA
Nutricionista – Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

PROF. DR. ADMAR COSTA DE OLIVEIRA
Orientador

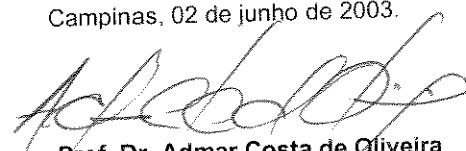
PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Flávia Queiroga Aranha de Almeida, aprovada pela Comissão Julgadora em 02 de junho de 2003.

CAMPINAS – SP

2003

Campinas, 02 de junho de 2003.


Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira
Presidente da Banca

200326312

UNIDADE	86
Nº CHAMADA	UNICAMP
	ALG 4a
V	EX
TOMBO BCI	54997
PROC.	16-124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/08/03
Nº CPD	

CM00187127-5

BIB ID 295917

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Almeida, Flávia Queiroga Aranha de
Ação antioxidante da vitamina E sobre a oxidação lipídica sérica
e hepática de ratos Wistar suplementados com ácidos graxos
poliinsaturados ômega-3/ Flávia Queiroga Aranha de Almeida. –
Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Admar Costa de Oliveira
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia de Alimentos.

1. Antioxidante 2. Vitamina E. 3. Ácidos graxos 4. Ômega-3
5. Rato. I Oliveira, Admar Costa de. II Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III Título.

FLÁVIA QUEIROGA ARANHA DE ALMEIDA
Nutricionista – Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

**AÇÃO ANTIOXIDANTE DA VITAMINA E SOBRE A OXIDAÇÃO
LIPÍDICA SÉRICA E HEPÁTICA DE RATOS WISTAR
SUPLEMENTADOS COM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS
ÔMEGA-3**

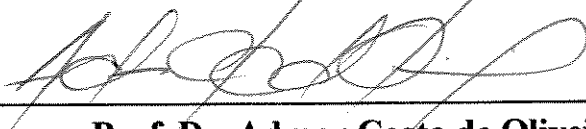
**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Ciência da
Nutrição – Área de Nutrição Básica e Experimental**

PROF. DR. ADMAR COSTA DE OLIVEIRA
Orientador

CAMPINAS – SP
2003

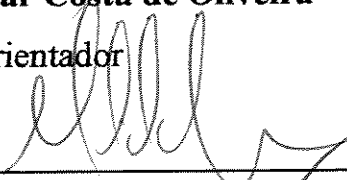
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

BANCA EXAMINADORA



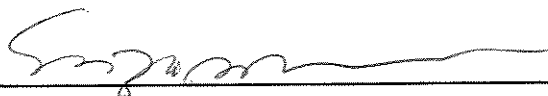
Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira

Orientador



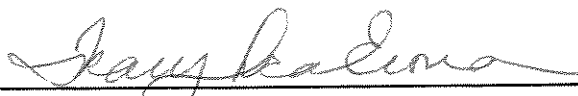
Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Membro



Profa. Dra. Suzana Lima de Oliveira

Membro



Profa. Dra. Iracy Lea Pecora

Membro



Profa. Dra. Semíramis Álvares Domene

Membro

Profa. Dra. Lúcia Nassi Castilho

Membro

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy

Membro

Ao meu esposo, *Marconi*, pelo incentivo constante,
aos meus pais, *Waldemar e Maria Helena*, pelo o amor e compreensão e
a minha irmã, *Eleide*, pelo apoio sempre, enfim, dedico este trabalho a eles, ***que
são a minha família, meu lar, minha vida.***

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, pela iluminação nessa caminhada e constante presença em minha vida.

Ao Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira, pela orientação e apoio na execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À M. CASSAB Comércio e Indústria Ltda., na pessoa do Prof. Dr. Olavo Rusig, pela doação da mistura vitamínica.

À Corn Products Brasil – Ingredientes Industriais Ltda., pela doação do amido dextrinizado, utilizado na elaboração das dietas experimentais.

À Dra. Soely Maria Pissini Machado Reis, pela ajuda constante.

Às amigas Andréa Scabora Boix Caro e Flávia Auler, pela valiosa ajuda e amizade desde o início.

À Maria Susana Corrêa Alves da Cunha, pela amizade e apoio técnico, durante a execução dos ensaios biológicos, no Laboratório de Ensaios Biológicos (LEB/DEPAN).

Aos funcionários do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, especialmente Cidinha, Robson, Fátima, Francisco, Eliana e Celis, pela ajuda durante todo o trabalho.

À Keila, Elizabete, Érika, Cristina e Karina, pela amizade.

Aos amigos Leonardo, Vera Elisa, Célia Márcia, Alice, Marleny, por todos os momentos especiais compartilhados nessa caminhada conquistada.

Não poderia deixar de agradecer a duas pessoas tão especiais nesta minha carreira: as Profas. Dra. Luiza Sonia Asciutti Moura e Maria da Conceição Gonçalves Rodrigues da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), pelo apoio, sempre torcendo por mim, mesmo distante, mas tão perto: “no coração”.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a execução de mais esta etapa da minha vida, muito obrigada hoje e sempre.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xx
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	07
2.1 Oxidação de lípides.....	08
2.2 Vitamina E.....	18
2.3 Ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) ômega-3 (ω -3).....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 Material.....	41
3.1.2 Animais para experimentação.....	41
3.2 Métodos Analíticos.....	42
3.2.1 Determinação do índice de peróxido (IP).....	42
3.2.2 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	42
3.2.3 Determinação de vitamina E (tocoferóis totais).....	43
3.2.4 Determinação da composição de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (AGPI) ômega-3 (ω -3).....	43
3.2.5 Extração e determinação lipídica.....	44
3.2.6 Determinação do colesterol total sérico e hepático e de suas frações (LDL, HDL e VLDL) e dos triacilgliceróis.....	45
3.2.7 Determinação de proteína bruta na caseína e nas dietas	

experimentais.....	47
3.2.8 Determinação de umidade.....	47
3.3 Ensaio Biológicos.....	47
3.3.1 Animais e dietas experimentais.....	47
3.3.2 Primeiro ensaio biológico.....	56
3.3.3 Segundo ensaio biológico.....	57
3.4 Avaliação do ganho de peso dos animais e do consumo de dieta.....	58
3.5 Análise Estatística.....	58
4 RESULTADOS.....	59
4.1 Caracterização química dos produtos utilizados nos ensaios biológicos.....	60
4.2 Primeiro ensaio biológico.....	61
4.2.1 Índice de peróxido (IP) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) hepáticos.....	61
4.2.2 Vitamina E (tocoferóis totais) hepática.....	62
4.2.3 Teores médios de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (AGPI) hepático.....	65
4.2.4 Lípidos totais hepáticos.....	67
4.2.5 Perfil lipídico sérico.....	69
4.2.6 Perfil lipídico hepático.....	74
4.2.7 Consumo médio de dieta (g) e peso médio (g) dos animais.....	76
4.3 Segundo ensaio biológico.....	78
4.3.1 Índice de peróxido (IP) sérico e hepático.....	78

4.3.2 Teores médios das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) sérico e hepático.....	80
4.3.3 Vitamina E (tocoferóis totais) sérica e hepática.....	82
4.3.4 Teores médios de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (AGPI) sérico e hepático.....	84
4.3.5 Lípidos totais séricos e hepáticos.....	87
4.3.6 Perfil lipídico sérico.....	88
4.3.7 Perfil lipídico hepático.....	92
4.3.8 Consumo médio de dieta (g) e peso médio (g) dos animais.....	94
5 DISCUSSÃO.....	96
5.1 Avaliação da oxidação lipídica através do índice de peróxido (IP) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) séricos e hepáticos.....	97
5.2 Teores médios de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (AGPI) sérico e hepático.....	100
5.3 Efeito protetor da vitamina E (tocoferóis totais) sérico e hepático.....	101
5.4 Teor de lípidos totais sérico e hepático.....	103
5.5 Perfil lipídico sérico e hepático.....	104
5.6 Consumo médio de dieta (g) e peso médio (g) dos animais.....	108
6 CONCLUSÕES.....	109
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema global do processo da oxidação.....	10
Figura 2. Mecanismo básico da decomposição de hidroperóxidos.....	14
Figura 3. Possíveis alterações nutricionais como consequência da peroxidação lipídica.....	17
Figura 4. Estrutura química da vitamina E.....	21
Figura 5. Estrutura do AGPI α -linolênico (C18:3, ω -3).....	27
Figura 6. Estrutura do AGPI eicosapentaenóico (EPA) (C20:5, ω -3).....	27
Figura 7. Estrutura do AGPI docosahexaenóico (DHA) (C22:6, ω -3).....	27
Figura 8. Esquema do metabolismo na formação dos AGPIs ω -3 EPA e DHA.....	38
Figura 9. Esquema do delineamento experimental do <i>primeiro ensaio biológico</i>	50
Figura 10. Esquema do delineamento experimental do <i>segundo ensaio biológico</i>	51
Figura 11 (A-B). Teores médios de índice de peróxido (IP) (A) e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (B) hepáticos de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	61
Figura 12. Teores médios de lípides totais séricos (mg/dl) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	69
Figura 13. Teores médios de colesterol total sérico (mg/dl) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	70
Figura 14. Teores médios de HDL-colesterol sérico (mg/dl) de ratos	

Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	71
Figura 15. Teores médios de LDL-colesterol sérico (mg/dl) de ratos Wistar suplementados nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	72
Figura 16. Teores médios de VLDL-colesterol sérico (mg/dl) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	73
Figura 17. Teores médios de triacilgliceróis séricos (mg/dl) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	74
Figura 18. Teores médios de colesterol total hepático (mg/g) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	75
Figura 19. Teores médios de triacilgliceróis hepáticos (mg/g) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	76
Figura 20 (A-B). Consumo médio de dieta por grupo (g) (A) e Peso médio (g) (B) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	77
Figura 21 (A-B). Teores médios de índice de peróxido (IP) sérico (A) e hepático (B) (mEq/kg) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	78
Figura 22 (A-B). Teores médios de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) sérico (A) e hepático (B) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	81

Figura 23. Teores médios de colesterol total sérico (mg/dL) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	88
Figura 24. Teores médios de HDL-colesterol sérico (mg/dL) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	89
Figura 25. Teores médios de LDL-colesterol sérico (mg/dL) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	90
Figura 26. Teores médios de VLDL-colesterol sérico (mg/dL) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	91
Figura 27. Teores médios de triacilgliceróis séricos (mg/dL) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	92
Figura 28. Teores médios de colesterol total hepático (mg/g) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	93
Figura 29. Teores médios de triacilgliceróis hepáticos (mg/g) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	94
Figura 30 (A-B). Consumo médio de dieta (g) (A) e Peso médio (g) (B) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades fisiológicas dos principais eicosanóides derivados do ácido araquidônico (AA) e ácido eicosapentaenóico (EPA).....	34
Tabela 2. Recomendações para ingestão de AGPI ω -3.....	37
Tabela 3. Composição da dieta basal AIN-93G.....	52
Tabela 4. Mistura mineral AIN-93G-MX.....	54
Tabela 5. Mistura vitamínica AIN-93G-VX.....	55
Tabela 6. Caracterização química dos produtos utilizados nos ensaios biológicos.....	60
Tabela 7. Teores médios de vitamina E (tocoferóis totais) hepáticos de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	64
Tabela 8. Teores médios de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (AGPI) encontrados no fígado (%) de ratos Wistar nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) de suplementação, com AGPI ω -3, com e sem vitamina E.....	66
Tabela 9. Teores médios de lípides totais hepáticos de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	68
Tabela 10. Teores médios de vitamina E (tocoferóis totais) séricos e hepáticos de ratos Wistar suplementados por gavagem por gavagem nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	83
Tabela 11. Teores médios de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (AGPI) encontrados no soro (%) de ratos Wistar nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) de	

suplementação, com AGPI ω -3, com e sem vitamina E.....	86
Tabela 12. Teores médios de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (AGPI) encontrados no fígado (%) de ratos Wistar nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) de suplementação, com AGPI ω -3, com e sem vitamina E.....	86
Tabela 13. Teores médios de lípides totais séricos e hepáticos de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).....	87

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido araquidônico

AGPI – Ácidos graxos poliinsaturados

BF₃ – Cloreto+ácido sulfúrico+metanol

BHA – Butil hidroxilanol

BNF – British Nutrition Foundation

BTH – Butil hidroxitolueno

COMA – Committee on Medical Aspects of Food Policy

DHA – Ácido docosahexaenóico

DMH – The Danish Ministry of Health

EPA – Ácido eicosapentaenóico

HDL – Lipoproteína de alta densidade

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LTB – Leucotrieno

MDA – Malonaldeído

MX – Mistura mineral

MV – Mistura vitamínica

PGI – Prostaciclina

P/S – Proporção entre gorduras poliinsaturadas e saturadas

PUFA – Polyunsaturated fatty acids

SOD – Superóxidos dismutases

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBHQ – T-butil hidroquinona

TXA – tromboxano

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

RESUMO

O objetivo, deste trabalho, foi estudar o possível efeito protetor da vitamina E sobre a oxidação lipídica no sangue e no fígado de ratos Wistar, alimentados conforme dietas AIN93-G e suplementados por gavagem com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3. Para o *primeiro ensaio biológico*, foram utilizados 60 ratos machos albinos, recém-desmamados, distribuídos aleatoriamente em 6 grupos experimentais, no qual foram divididos, de acordo com a quantidade de suplemento e marca, com e sem vitamina E: GRUPO 1 - Controle - Suplementação com 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 - Suplementação com 2 g/dia de ácidos graxos ômega-3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 - Suplementação com 2 g/dia de ácidos graxos ômega-3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 4 - Suplementação com 1 g/dia de ácidos graxos ômega-3 da **marca A**, com vitamina E (60 mg/dia); GRUPO 5 - Suplementação com 1 g/dia de ácidos graxos ômega-3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 6 - Suplementação com 2 g/dia de ácidos graxos ômega-3 da **marca B**, sem vitamina E, por um período de 30 dias e, posteriormente, durante 15 dias, suplementação com vitamina E (**marca C** - 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1. Foram realizadas análises em três tempos: T0 - valor de referência após 3 dias em adaptação com dieta basal (sacrificados 12 animais, n=12); T1, com 30 dias de suplementação (sacrificados 4 animais por grupo, n=8), e T2, aos 45 dias de suplementação (sacrificados 4 animais por grupo, n=4). Para o *segundo ensaio biológico*, foram utilizados 80 ratos machos albinos, da linhagem Wistar, recém-desmamados. Inicialmente os 80 animais foram pesados e submetidos a um período de aclimação ao ambiente, em gaiolas de crescimento individuais,

durante 8 dias, em dieta não purificada de fórmula fechada Nuvital[®], para ganho de peso; em seguida, foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, com 16 animais por grupo; os mesmos permaneceram por 4 dias em adaptação recebendo dieta basal e, ao final desse período, era feito o alinhamento do peso, retirando 4 animais por grupo, que foram sacrificados para análise lipídica do sangue e fígado; essa análise foi considerada “valor de referência” e denominada “Tempo 0”. Permaneceram 64 animais (16 animais por grupo) dos quais, após 30 dias de experimento foram retirados 8 animais por grupo, para análise de sangue e fígado, denominado “Tempo 1”, e, após 15 dias, foi feita mais uma análise, denominada “Tempo 2”, nos animais restantes por grupo, para as avaliações dos perfis lipídicos sérico e hepático, dos lípides totais, ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e dosagem de vitamina E, como também a ação antioxidante da vitamina E. Os animais foram suplementados por gavagem, durante 45 dias consecutivos, por via oral. Os grupos experimentais, em estudo, foram divididos de acordo com a quantidade de suplemento com e sem vitamina E: GRUPO 1 - Controle - suplementação com 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – Suplementação com 2 g/dia de ácidos graxos ômega-3 da **marca A**, com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 - Suplementação com 2 g/dia de ácidos graxos ômega-3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 4 – Suplementação com 2 g/dia de ácidos graxos ômega-3 da **marca B**, sem vitamina E, por um período de 30 dias e posteriormente durante 15 dias, suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1. No que diz respeito ao efeito antioxidante da vitamina E, nos teores de índice de peróxido (IP) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), observou-se que, nos grupos experimentais que receberam suplementação de AGPI ω -3

sem vitamina E, os teores de índice de peróxido e também os teores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico apresentaram valores muito superiores do que nos grupos experimentais que receberam suplementos de AGPI ω -3 com vitamina E. Assim, verificou-se que a vitamina E mostrou uma proteção efetiva contra a oxidação lipídica, em ratos Wistar, suplementados com produtos à base de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) ômega-3 (ω - 3). Observou-se que não houve diferença significativa ($p>0,05$), nas médias no consumo de dieta (g) e do ganho de peso (g), entre os grupos em estudo, mostrando que as suplementações à base de ácidos graxos poliinsaturados ω -3, com e sem vitamina E, não interferiram nessas variáveis; que o tempo de suplementação com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 não foi capaz de melhorar o perfil lipídico sérico dos ratos, observando-se apenas uma redução dos teores de LDL-colesterol sérico dos ratos. A suplementação com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 não reduziu os teores hepáticos do colesterol total e triacilgliceróis dos ratos. Com relação à variação dos teores no sangue e no fígado dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, observou-se que, ao longo da suplementação de 45 dias com AGPI ω -3, houve um aumento nos teores de ácidos graxos saturados palmítico, esteárico e dos insaturados, ácido oléico, α -linolênico e DHA. A adição da vitamina E não interferiu nos teores encontrados. Tendo em vista os resultados encontrados, fica a recomendação de que, ao fazer uso de suplementação com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, sob forma concentrada em cápsulas gelatinosas, a mesma deve estar associada com vitamina E, para evitar os riscos de oxidação ao nível celular e, com isso, causar efeitos danosos a saúde.

ABSTRACT

The objective of this research was to study a possible protective effect of vitamin E against lipid oxidation in the blood and liver of Wistar rats fed on a AIN93-G diet supplemented by gavagem with polyunsaturated omega-3 fatty acids. For the *first biological assay*, 60 albino recently weaned male Wistar rats were used, distributed at random into 6 experimental groups. The experimental groups under study were divided according to the amount and brand of supplement, with and without vitamin E: GROUP 1 – Control – supplementation with 2 g/day soybean oil; GROUP 2 – supplementation with 2 g/day **brand A** omega-3 fatty acids with vitamin E (120 mg/day); GROUP 3 - supplementation with 2 g/day **brand B** omega-3 fatty acids without vitamin E; GROUP 4 - supplementation with 1 g/day **brand A** omega-3 fatty acids with vitamin E (60 mg/day); GROUP 5 - supplementation with 1 g/day **brand B** omega-3 fatty acids without vitamin E; GROUP 6 - supplementation with 2 g/day **brand B** omega-3 fatty acids without vitamin E for a period of 30 days and subsequently for 15 days with vitamin E (**brand C** – 400 mg DL- α - tocopherol). In this group no animals were sacrificed at Time 1. In the *second biological assay*, 80 albino recently weaned male Wistar rats were used. Analyses were carried out at 3 points in time: T0 – reference value after 3 days of adaptation on the basal diet (12 animals sacrificed, n=12); T1 after 30 days of supplementation (4 animals sacrificed per group, n=8) and T2 after 45 days of supplementation (4 animals sacrificed per group, n=4). The 80 animals were first weighed and submitted to an eight day period of acclimatization to the environment in individual growth cages, fed on a non-purified closed formula Nuvital® diet in order to gain weight. They were then distributed at random into four experimental groups, 16 animals per group, and fed for a further 4 days of adaptation on the basal diet

before carrying out a weight alignment, when 4 animals per group were removed and sacrificed for a lipid analysis of their blood and liver. This analysis was considered as the “reference value” and denominated “Time 0”. Sixty-four animals thus remained (16 animals per group) of which, after 30 days of the experiment, 8 animals per group were removed for blood and liver analyses, denominated “Time 1”, and after a further 15 days, another analysis, denominated “Time 2” was carried out on the remaining animals to evaluate the serum and hepatic lipid profiles, total lipids, omega-3 polyunsaturated fatty acids and the vitamin E content, as well as the anti-oxidant activity of the vitamin E. The animals were supplemented by gavagem for 45 consecutive days, via oral. The experimental groups under study were divided according to the amount and brand of supplement, with and without vitamin E: GROUP 1 – Control – supplementation with 2 g/day soybean oil; GROUP 2 – supplementation with 2 g/day **brand A** omega-3 fatty acids with vitamin E (120 mg/day); GROUP 3 – supplementation with 2 g/day **brand B** omega-3 fatty acids without vitamin E; GROUP 4 – supplementation with 2 g/day **brand B** omega-3 fatty acids without vitamin E; GROUP 5 – supplementation with 2 g/day **brand B** omega-3 fatty acids without vitamin E for a period of 30 days and subsequently for 15 days with vitamin E (**brand C** – 400 mg DL- α - tocopherol). In this group no animals were sacrificed at Time 1. With respect to the anti-oxidant effect of vitamin E on the peroxide index (PI) values and on the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), it was observed that in the experimental groups receiving ω -3 PUFA without vitamin E, the values for PI and for TBARS were much higher than for the experimental groups supplemented with ω -3 PUFA with vitamin E. Thus it was shown that vitamin E had a protective effect against lipid oxidation at the cellular level in Wistar rats supplemented with products based on ω -3 PUFA.

No significant difference ($p>0.05$) was observed between the means for diet consumption (g) and weight gain (g), showing that supplementation with ω -3 PUFA, with and without vitamin E, did not interfere with these variables, and that the time of supplementation with ω -3 PUFA was not capable of improving the serum lipid profile of the rats, just a reduction in the levels of serum LDL-cholesterol being observed. Supplementation with ω -3 PUFA did not reduce the levels of total cholesterol or triglycerides in the rat livers. With respect to the variation of the levels of saturated, mono-unsaturated and poly-unsaturated fatty acids in the blood and liver, it was observed that during the 45 days of supplementation with ω -3 PUFA, there was an increase in the levels of the saturated fatty acids palmitic and stearic acids, oleic acid, α -linolenic acid and DHA. The addition of vitamin E did not interfere with the values found. Considering the results obtained it can be recommended that, if using supplementation with ω -3 PUFA in a concentrated form in soft gels, it should be associated with vitamin E to avoid risks of oxidation at the cellular level, thus causing damage to the health.

1 INTRODUÇÃO

Muitas pesquisas têm demonstrado os efeitos benéficos à saúde que os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) da família ômega-3 (ω -3) podem gerar (Kinzella et al., 1990; Bagga et al. 1997; Inés et al., 1999), tendo intensificado o uso do óleo de peixe, na forma concentrada, em cápsulas gelatinosas com elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados, em especial de eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), em processo terapêutico ou como complemento nutricional, visando principalmente à prevenção de distúrbios vasculares. As cápsulas de óleo de peixe estão disponíveis no comércio com vários nomes (marcas registradas), contendo AGPI ω -3 em diferentes concentrações, com ou sem vitamina E. Os requerimentos diários de AGPI ω -3, em humanos, não estão bem definidos; entretanto, têm-se proposto a ingestão de 1 ou 2 cápsulas diárias de 1000 mg que fornecem uma quantidade suficiente de EPA e DHA para obter benefícios nutricionais e eventualmente farmacológicos (Vannucchi & Campana, 1991).

Os ácidos graxos insaturados, que têm importância biológica, são os isômeros *cis* (Moraes & Santos, 1998). Dentro desse contexto, enfatizamos os poliinsaturados de cadeia longa (AGPI), uma vez que fazem parte da composição dos fosfolípidos de membranas, onde são ácidos funcionais e precursores de prostaglandinas. O termo poliinsaturados é usado para aqueles que contêm mais de uma dupla ligação, também conhecidos por PUFA (do inglês "*polyunsaturated fatty acids*") (Vannucchi & Campana, 1991).

Os AGPI são compostos em que a primeira dupla ligação pode ocorrer no terceiro ou no sexto átomo de carbono a partir do carbono metílico terminal, ω -3 e ω -6, respectivamente. Os AGPI não são sintetizados pelo organismo, por isso são considerados essenciais, e têm que ser fornecidos

através da dieta, mais particularmente o linoléico (18:2, ω -6) e o α -linolênico (18:3, ω -3). Esses ácidos graxos são precursores de importantes lípides estruturais, como os fosfolípidos nas membranas celulares ou dos eicosanóides com funções reguladoras, como as prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos (Vannucchi et al., 1990).

Os AGPI de cadeia longa ω -3, cuja fonte dietética são as microalgas, os peixes gordurosos de águas frias e profundas (salmão e atum), tem papel relevante na prevenção de doenças cardiovasculares (Vergara, 2000; Pollonio, 2000), sendo reconhecidos como nutrientes cardioprotetores. Também são utilizados em alguns produtos para gestantes e lactentes para promover um melhor desenvolvimento cerebral e da visão em crianças (Pacchioni, 1999). O percentual de gordura nos peixes pode classificá-los como: peixes magros, com menos de 1% de gordura (bacalhau, carpa, pescada, truta e linguado); peixes semigordos, com 7 a 8% de gordura (salmão, arenque, cavala), e peixes gordos, com mais de 15% de gordura (atum e enguia) (Germano et al., 1998). O valor biológico das gorduras dos peixes é importante na prevenção do ateroma (Ferretti et al., 1994), devido à presença de grande número de AGPI ω -3. Diversos estudos populacionais constataram que dietas com alto consumo de peixes gordurosos, ricos em AGPI ω -3, têm efeito protetor contra derrame cerebral, doenças cardiovasculares e diabetes (Takemoto, 1999). Recomenda-se que os AGPI ω -3 compreendam entre 10 e 20% dos AGPI da dieta (Vannucchi et al., 1990).

De acordo com Birch et al. (2002), crianças que receberam fórmulas contendo AGPI, após desmame, mostraram melhor maturação da função

cortical do que aquelas crianças que não receberam essa suplementação; o período crítico durante o qual a suplementação em AGPI influencia a maturação da função cortical se prolonga além das 6 semanas de idade.

Trabalhos de pesquisa sobre o infarto do miocárdio, em homens entre 50 e 55 anos de idade, revelaram que a mortalidade foi maior nos países onde há grande consumo de gordura de mamíferos, tal como ocorre na França, Inglaterra, Finlândia e Estados Unidos (Ascherio et al., 1995). Na Dinamarca, por exemplo, a ingestão diária de gordura é da ordem de 140g contra 125g nos Estados Unidos, mas a taxa de infarto é 33% menor do que a americana, pois é o óleo de peixe que constitui a maior parte da gordura ingerida pelos dinamarqueses.

O óleo de peixe possui em sua composição uma grande quantidade de AGPI, como o EPA (20:5, ω -3) e o DHA (22:6, ω -3), que são recomendados na prevenção de doenças cardíacas, diabetes e pressão alta, além de estarem presentes nas estruturas de tecidos nervosos e cerebrais (Wanasundara & Shahidi, 1996; Fantoni et al., 1996). Entretanto, esses compostos são muito suscetíveis à autooxidação (Frankel, 1984) e a sua ingestão sob a forma oxidada pode exercer um papel importante na geração de câncer, na inibição da síntese de prostaciclina, aterosclerose, derrame cerebral, inflamações e no processo de envelhecimento (Frankel, 1984; Lin et al., 1995; Fantoni et al., 1996). Deve-se levar em consideração que o alto nível de AGPI intensifica os processos oxidativos (Lanzillotti, 2002), com conseqüente formação de compostos indesejáveis como radicais livres, peróxidos, hidroperóxidos e outros produtos secundários e terciários da oxidação lipídica. Para evitar o processo oxidativo, é usualmente utilizada a associação com vitamina E, que é

um antioxidante natural, lipossolúvel, capaz de quebrar a reação em cadeia da autooxidação lipídica e a formação de radicais livres nas membranas celulares, prevenindo a formação de hidroperóxidos (Jackson, 1994).

Segundo Allen & Hamilton (1983), os processos oxidativos podem ser evitados através da modificação das condições ambientais ou pela utilização de substâncias antioxidantes com a propriedade de impedir ou diminuir o desencadeamento das reações oxidativas. Como substância antioxidante, convém destacar o papel da vitamina E. O α -tocoferol, principal e mais ativo constituinte dos isômeros, coletivamente conhecidos como vitamina E, é o mais importante seqüestrante de radicais livres em membranas e lipoproteínas (Halliwell, 1994; Halliwell et al., 1995; Wiseman, 1996).

Com o objetivo de verificar o possível efeito protetor da vitamina E sobre a oxidação lipídica no sangue e fígado de ratos Wistar, alimentados com dietas suplementadas com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, foram enfocadas neste trabalho, as seguintes investigações:

✧ Determinação do índice de peróxido na dieta AIN93-G, no óleo de soja, nos suplementos de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, no sangue e no fígado dos ratos e determinação do valor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na dieta AIN93-G, no óleo de soja, nos suplementos de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, no sangue e no fígado dos ratos, como indicadores da oxidação lipídica;

✧ Determinação da vitamina E (tocoferóis totais) na dieta AIN93-G, no óleo de soja, nos suplementos de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, no sangue e no fígado dos ratos;

✧ Composição de ácidos graxos no óleo de soja, nos suplementos de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 a serem utilizadas no estudo, na dieta AIN93-G, no sangue e no fígado dos ratos;

✧ Determinação do conteúdo lipídico na dieta AIN93-G, no sangue e no fígado dos ratos;

✧ Determinação de triacilgliceróis, do colesterol total e suas frações (LDL, HDL e VLDL) no sangue e no fígado dos ratos;

✧ Monitoramento da composição em ácidos graxos no sangue e no fígado dos ratos ao longo da suplementação;

✧ Monitoramento do peso dos ratos durante os experimentos para observação do crescimento e o consumo de dieta.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Oxidação de lípidos

O encapsulamento de óleos ricos em AGPI ω -3 tem-se transformado num processo muito comum, já que, além de isolar o óleo do meio ambiente, evitando o contato com o oxigênio e, portanto, sua oxidação, a cápsula torna esse suplemento alimentar muito mais bem aceito no mercado, evitando o sabor e odor característico do óleo de peixe (Breivik, 1992). A vulnerabilidade do óleo de peixe à oxidação está diretamente relacionada ao seu grau de insaturação, de modo que o número de duplas ligações e, mais exatamente, de unidades pentadiénicas (estrutura formada por 5 carbonos e duas duplas ligações), que possui o óleo de peixe, consiste num fator determinante na sua susceptibilidade em desenvolver a rancidez oxidativa (Uauy & Valenzuela, 1992).

O início da oxidação lipídica decorre da interação de um iniciador com o oxigênio, que uma vez ativado, pode reagir com o ácido graxo insaturado, ocorrendo a retirada de um átomo de hidrogênio do carbono metilênico adjacente à ligação dupla *cis* do ácido graxo insaturado, resultando na formação de radicais alílicos, segundo a reação citada por Ferrari (1998):

INICIAÇÃO

1. $R-H + \text{iniciador} \rightarrow R^{\bullet}$ (Radical carbonil).

Uma vez iniciada, a reação segue em cadeia e somente termina quando estiverem esgotadas as reservas de ácidos graxos insaturados e oxigênio (Kirk, 1984) ou quando dois radicais livres se ligam, ou ainda pela ação de

antioxidante, como o α -tocoferol (Halliwell & Chirico, 1993). Assim sendo, a fase de propagação, que ocorre em seguida, é caracterizada por diversas reações:

PROPAGAÇÃO

2. $R^{\bullet} + O_2 \rightarrow RO_2^{\bullet}$ (Radical peroxil)
3. $RO_2^{\bullet} + R-H \rightarrow R^{\bullet} + ROOH$ (Lipohidroperóxido)
4. $2ROOH \rightarrow RO_2^{\bullet} + RO^{\bullet} + H_2O$

As reações de propagação levam à formação de diversos peróxidos, que podem ser mensurados, servindo como índice de oxidação lipídica, seja em alimentos (Gray, 1978; Wang et al., 1995) ou mesmo no organismo humano (Halliwell & Chirico, 1993). Todavia, como os peróxidos são instáveis, sua mensuração é limitada às fases iniciais da oxidação lipídica, já que as reações continuam a ocorrer até a fase de terminação (Sevanian & Hochstein, 1985):

TERMINAÇÃO

5. $RO_2^{\bullet} + RO_2^{\bullet} \rightarrow ROOR + O_2$
6. $RO_2^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow ROOR$
7. $R^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow RR$ (Dímeros ou polímeros).

Dessa maneira, com o esgotamento dos substratos, as reações de propagação vão cessando e restam os produtos finais. Assim, as reações de terminação têm como característica a formação de produtos finais estáveis ou não reativos. Os radicais alcoxil ($RO^{\bullet}$), que participam de reações de decomposição, também podem sofrer epoxidação, polimerização (reação 5) ou

reagir com grupos alquila ($R^\bullet$) (reação 6), reações químicas representativas da fase de terminação (Kubow, 1992), como está demonstrado na Figura 1.

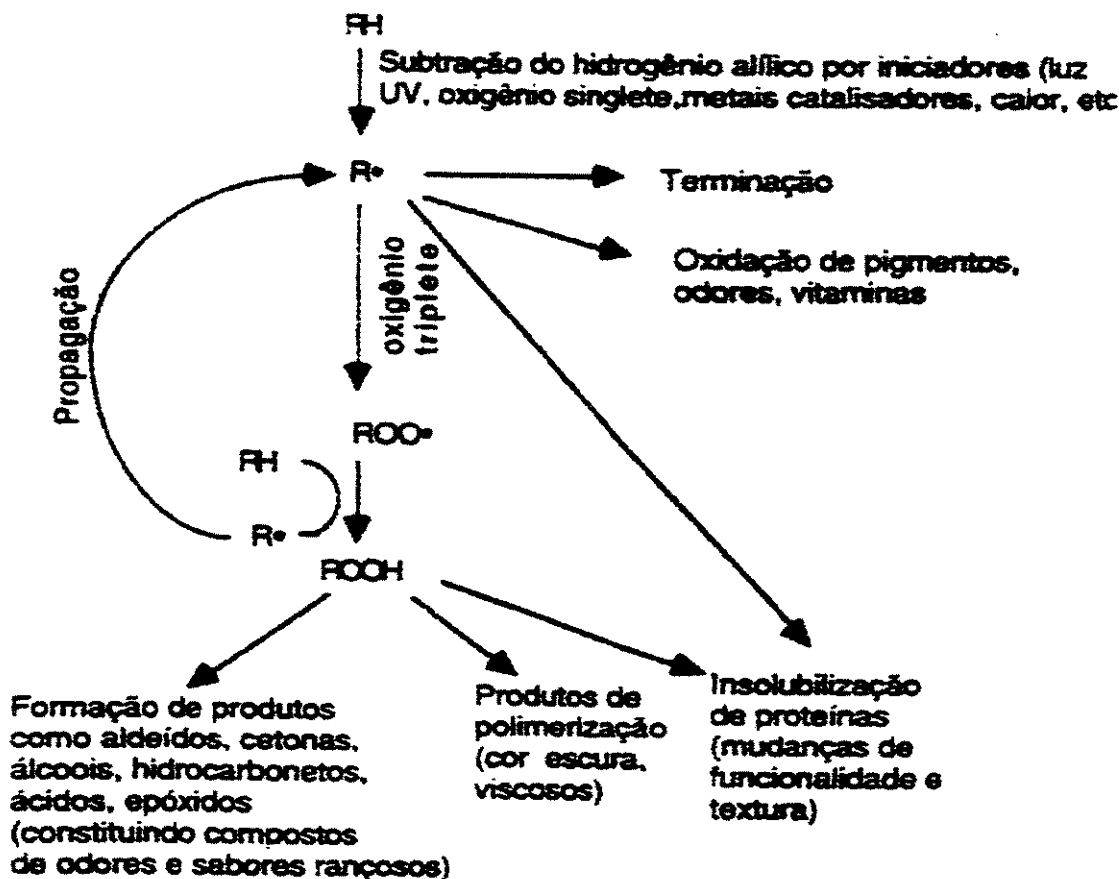


Figura 1. Esquema global do processo de oxidação.

Fonte: Hilst (1999).

Esse mecanismo se inicia com a formação de radicais livres que, devido a sua alta energia de ativação (em torno de 146kJ/mol), necessita ser catalisada com aquecimento, exposição à luz, radiação, presença de íons metálicos, etc. Depois dessa fase de iniciação, a oxidação é propagada pela remoção de átomos de hidrogênio nas posições α das ligações duplas de ácidos graxos, produzindo radicais livres. A adição de oxigênio então ocorre

nessas posições, resultando na formação de radicais peróxidos, que abstraem de radicais peróxidos. Este abstrai hidrogênio, dos grupos α -metileno, de outras moléculas para formar hidroperóxidos e um novo radical livre, que reage com oxigênio; e o mecanismo se repete até radicais se combinarem para formar produtos que não alimentem a reação de propagação (Frankel, 1984; Nawar, 1996).

A formação dos primeiros radicais livres necessários para iniciar o processo de autooxidação ainda não está absolutamente esclarecida. Uma das hipóteses consideradas mais viáveis para a formação desses é através do ataque do oxigênio *singlet* ($^1\text{O}_2$) à dupla ligação de lipídios insaturados. Através da energia transmitida, por um fotocatalisador, ao oxigênio, poderá ocorrer uma inversão do *spin* de um elétron não ligante desse oxigênio *triplet* ($^3\text{O}_2$), deixando-o com dois elétrons paralelos e um orbital vazio (Nawar, 1996). O oxigênio *singlet* ($^1\text{O}_2$) formado é mais eletrofilico que o *triplet* ($^3\text{O}_2$). Assim, reage rapidamente com as duplas ligações de alta densidade eletrônica formando hidroperóxidos (Frankel, 1984; Nawar, 1996).

As taxas de oxidação de lípidos são influenciadas por vários fatores: a temperatura do ambiente é uma variável importante, já a presença de oxigênio nas vizinhanças do alimento leva a um acréscimo na taxa de oxidação. Da mesma forma, a oxidação ocorre em maiores velocidades, conforme o teor de água, vai se tornando muito baixo (Singh et al., 1976).

Entre os métodos utilizados para acompanhar o processo de oxidação de lípidos, o valor de peróxido é aplicável para observar a sua formação nos

primeiros estágios do processo de oxidação, sendo, entretanto, empírico, de acuracidade questionável e variável, em função dos procedimentos utilizados, incluindo-se a temperatura na qual o teste é realizado (Nawar, 1996).

No entanto, a vitamina E pode interromper a reação em cadeia iniciada pelos radicais livres, na fase de propagação. Para tanto, ela própria se torna um radical livre, porém menos reativo devido a sua localização no anel aromático (Halliwell, 1991).

Garrido et al. (1993) investigaram o papel do α -tocoferol na susceptibilidade de membranas de eritrócitos ao estresse oxidativo, induzido pela ingestão de altas doses de óleo de peixe em ratos jovens e idosos. Observaram uma susceptibilidade menor nos animais jovens que receberam suplementação vitamínica, do que nos idosos. Essa diferença foi atribuída a uma reduzida capacidade do α -tocoferol em seqüestrar radicais livres no segundo grupo, uma vez que sua concentração no plasma e eritrócitos encontrava-se elevada. Por outro lado, a susceptibilidade ao estresse apresentou-se aumentada.

A suplementação com AGPI ω -3, na dieta, pode causar a peroxidação das LDL-colesterol, com alterações significativas das propriedades físicas e biológicas das LDL-colesterol no homem. Essas alterações poderiam provocar acúmulo de colesterol nas paredes dos vasos arteriais e conseqüentemente aumento da aterogenicidade (Nordøy & Dyerberg, 1989).

O fenômeno de oxidação da LDL é conseqüência da ação de radicais

livres, levando à peroxidação dos ácidos graxos dos fosfolípidios, triacilgliceróis, ésteres de colesterol e colesterol livre (Steinbrecher et al., 1989; Halliwell & Chirico, 1993, Aviram, 1993). Os produtos de oxidação da LDL exercem vários mecanismos aterogênicos, atuando como substâncias quimiotáticas para os monócitos, favorecendo a migração de macrófagos e citotóxicas. A LDL oxidada altera a expressão genética das células arteriais, e ativa a resposta imune que, por sua vez, modula a resposta inflamatória (Liu et al., 1994).

O método clássico para se determinar os hidroperóxidos, que são produtos primários da oxidação, é o índice de peróxido. O método iodométrico da AOAC (Cd 8-53) é determinado em miliequivalentes (mEq) de peróxido ou oxigênio por 1000 gramas de amostra (Shahidi, 1995).

Segundo Hudson & Gordon (1994), embora os peróxidos e os hidroperóxidos formados nos óleos e gordura não tenham sabor, sua presença é um indicador seguro da inevitável alteração de aroma e sabor que irá se perceber. Como são muito instáveis, poderão sofrer quebra, à temperatura ambiente, produzindo uma variedade de moléculas de cadeias menores, especialmente compostos carbonila, que alteram o aroma e gosto característico do óleo. O índice de peróxido é um indicador muito sensível dos primeiros estágios da deterioração oxidativa. Porém, a temperaturas suficientemente elevadas, enquanto o oxigênio está sendo absorvido, os peróxidos estão sendo decompostos mais rapidamente do que sendo gerados. Assim, óleos podem ter alteração de sabor, curtos períodos de indução, mas possuir baixos índices de peróxidos.

A decomposição de hidroperóxidos por quebra de ligações C-C, com formação de compostos voláteis, constitui a base molecular da rancidez oxidativa (Chan et al., 1982). O processo básico de decomposição de hidroperóxidos foi descrito por Nawar (1985). A primeira etapa é uma cisão da ligação O-O, originando um radical alcóxi e uma hidroxila. A segunda etapa envolve a quebra de ligações C-C, em cada lado do grupo alcóxi. Geralmente, uma quebra no ponto, indicado na Figura 2 pela letra *a*, produz um aldeído e um ácido (ou éster). Uma quebra no ponto *b* resulta na formação de um radical alquil, que pode se combinar a um radical hidroxila para formar um álcool, perder um hidrogênio para formar um alceno, ou se oxidar para produzir um hidroperóxido (Nawar, 1985).

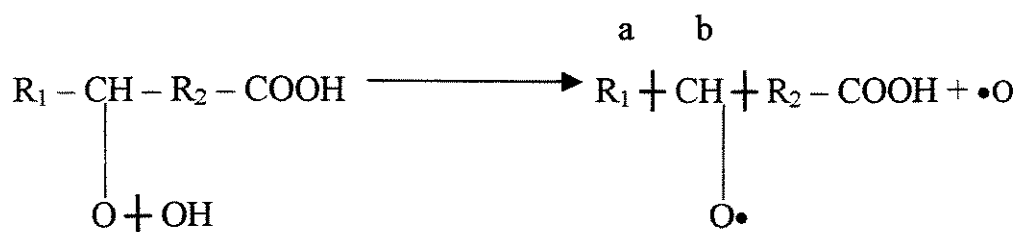


Figura 2. Mecanismo básico da decomposição de hidroperóxidos.

Fonte: Nawar (1985).

Um outro parâmetro para determinação da oxidação lipídica é o malonaldeído (MDA), que é um aldeído de cadeia curta, sendo um dos compostos medidos pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). A formação de malonaldeído ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica, em sistemas biológicos, em células e tecidos (Bonnes & Guérin, 1996).

Um dos aldeídos mais estudados é o malonaldeído, que constitui um bom índice de oxidação lipídica, uma vez que ele se correlaciona bem com a taxa de consumo de oxigênio na oxidação de ácidos graxos e com os teores de gordura e ácidos graxos insaturados, tanto em alimentos e sistemas modelo, quanto em estudos dietéticos com seres humanos e ratos, além de representar um componente tóxico, substâncias tóxicas que contribuem para a ocorrência de processos como aterosclerose e, possivelmente o câncer (Ferrari, 1998). As fontes de malonaldeído podem ser exógenas, originárias da oxidação de ácidos graxos alimentares, ou endógenas, derivadas da oxidação de fosfolipídios de biomembranas (Dahle et al., 1962) e da decomposição de ácido araquidônico, pela cicloxigenase, na síntese de prostaglandinas (Pryor et al., 1976). O malonaldeído é um composto 1,3-dicarbonil ($C_3H_4O_2$) de cadeia curta, baixo peso molecular, volátil e de fraco potencial ácido (Janero, 1990). O malonaldeído pode ser encontrado no sangue (Wasowicz et al., 1993) e seu metabolismo oxidativo processa-se em mitocôndrias, através da atividade da enzima aldeído-desidrogenase, ocorrendo a formação de intermediários que sofrem descarboxilação com a produção final de CO_2 (60-70%), apesar de ocorrer também a excreção do malonaldeído nas fezes (5-15%) e urina (9-17%) (Siu & Draper, 1982).

O teste com TBA refere-se à reação do ácido 2-tiobarbitúrico com os ácidos graxos insaturados de produtos oxidados, produzindo um pigmento vermelho, quantificado através espectrofotômetro a 532 nm (Tarladgis et al., 1960). A coloração é formada a partir do cromóforo produzido na reação de duas moléculas de TBA com uma molécula de malonaldeído (um produto carbonílico secundário) que pode ser encontrado em produto oxidado.

Como resultado da peroxidação lipídica, uma grande variedade de aldeídos são produzidos, incluindo-se o hexanal, o malonaldeído (MDA) e o 5-hidroxinonenal. Através da reação desses aldeídos com o TBA, obtém-se um composto colorido, quantificável por espectrofotometria. Como a reação não acontece somente com o MDA, o método mais apropriado detecta e quantifica as TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Um problema encontrado, ao se utilizar o TBARS como indicador de malonaldeído, é que esse último pode ser originário de outras vias, além da peroxidação lipídica, e o teste apresentar resposta positiva para outros produtos de oxidação (Valenzuela, 1991; Alessio, 1993; Favier, 1994). Contudo, embora diferentes métodos físicos e químicos possam ser empregados, na determinação de peroxidação lipídica, em amostras biológicas, a medida de MDA, a partir da formação de endoperóxidos, durante o último estágio de oxidação de AGPI pelo teste de TBARS, tem sido ainda a mais utilizada como indicador de oxidação (Valenzuela, 1991).

Kanner (1994) descreveu algumas conseqüências nutricionais da oxidação lipídica para a saúde como, por exemplo, destruição parcial dos ácidos graxos insaturados essenciais linoléico e linolênico; formação de produtos secundários da oxidação lipídica (malonaldeído e outros compostos) e compostos de Maillard, capazes de reagir com biomoléculas, principalmente proteínas com diminuição da absorção; irritação da mucosa intestinal por peróxidos, que provoca diarreia e diminui a capacidade de absorção; formação de lipídios oxidados que são antagonistas de diversos nutrientes, como a tiamina, o pantotenato de cálcio, a riboflavina, o ácido ascórbico, a vitamina B₁₂, os tocoferóis, a vitamina A, as proteínas, a lisina e os

aminoácidos sulfurados. Além desses efeitos, com a oxidação, são formados diversos lipídios oxidados e outras substâncias potencialmente tóxicas.

Em diversos estudos (Esterbauer et al., 1991; Kubow, 1992; Esterbauer, 1993) sobre a oxidação lipídica, tem sido enfatizada a enorme relevância em termos toxicológicos, de compostos carbonila de baixo peso molecular, especialmente aldeídos, como o malonaldeído, a acroleína e outros 2-alcenais, o 2,4-decadienal, o 2,4-nonadienal, o 4-hidroxinonenal, o 4-hidroxilhexenal e os alcanais também são formados. As alterações das características nutricionais que podem ocorrer como consequência da peroxidação lipídica são apresentadas na Figura 3.

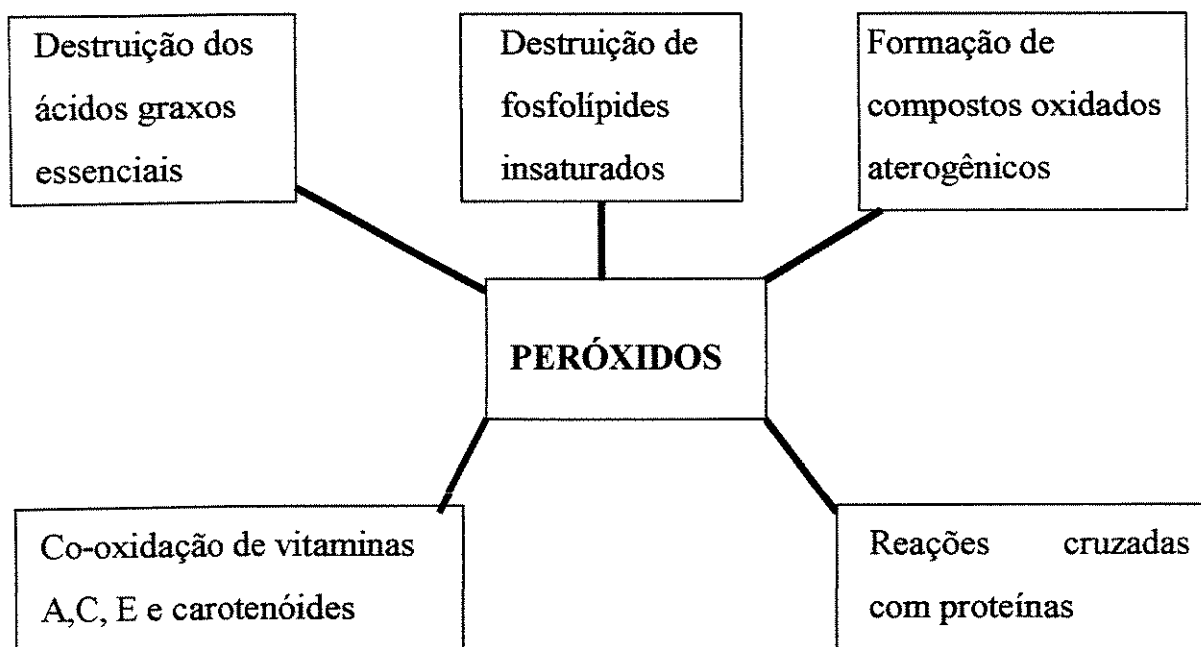


Figura 3. Possíveis alterações nutricionais como consequência da peroxidação lipídica.

Fonte: Silva (1997).

Os AGPI ω -3 das membranas, por exemplo, são muito vulneráveis ao ataque de radicais livres. Esses agentes desencadeiam reações de oxidação nos ácidos graxos da membrana lipoprotéica, denominadas de peroxidação lipídica, que afetam a integridade estrutural e funcional da membrana celular, alterando a sua fluidez e permeabilidade. Além disso, os produtos da oxidação dos lipídios da membrana podem causar alterações em certas funções celulares, como, por exemplo, modificações nas proteínas celulares, resultando em sua fragmentação, agregação e, em certos casos, ativação ou inativação de certas enzimas devido à reação dos radicais livres com aminoácidos constituintes da cadeia polipeptídica. A reação dos radicais livres com ácidos nucleicos também foi observada, gerando mudanças em moléculas de DNA e acarretando certas alterações cromossômicas (Soares, 2002).

2.2 Vitamina E

Algumas vitaminas têm ação antioxidante (vitaminas E, A, C e carotenóides), são capazes de prevenir os efeitos deletérios da oxidação (Jackson, 1994) e atuam através de dois mecanismos distintos: impedindo a etapa de iniciação ou seqüestrando os radicais livres (Hsieh & Kinsella, 1989). O primeiro mecanismo envolve a eliminação das espécies que possibilitam a etapa de iniciação, isto é, as espécies reativas do oxigênio, e os antioxidantes atuam decompondo o peróxido de hidrogênio, suprimindo oxigênio “singlet” e/ou quelação de metais pró-oxidantes. O segundo envolve a eliminação de dois radicais importantes na etapa de propagação, radicais alcoxila e peroxila. Nesse caso, os antioxidantes são denominados seqüestradores de radicais livres, sendo substâncias doadoras de prótons ou de elétrons (Silva, 1997). Os

antioxidantes são compostos naturais ou sintéticos (BHT, TBHQ, BHA) que retardam a oxidação, pois reagem com os radicais livres formados nas etapas iniciais da oxidação para formar produtos intermediários estáveis (Valenzuela et al., 1993).

A vitamina E consiste em um termo coletivo para um grupo de tocoferóis e tocotrienóis que ocorrem naturalmente em plantas, ambos contendo um anel cromanol e uma cadeia lateral fitila. As diferentes substituições metila no anel aromático originam os compostos α , β , γ , e δ . A distinção entre os dois subgrupos se dá, então, pela existência, nos tocotrienóis, de três duplas ligações na cauda hidrofóbica, que ancora a molécula nas membranas ou lipoproteínas; nos tocoferóis, a cadeia é totalmente saturada. Essa diferença estrutural, portanto, responde pelas diferentes ações biológicas de ambos compostos (Packer, 1995 citado por Oliveira, 1999).

De acordo com McGuire & Fritsche (1997), os níveis de α -tocoferol das células imunes em ratos aumentaram significativamente com o tempo de suplementação com óleo de peixe; além disso, o enriquecimento rápido das células imunes com AGPI ω -3 depende da dosagem e pode comprometer o *status* antioxidante dessas células.

O sistema de defesa antioxidante protege as células dos efeitos danosos dos radicais livres, evitando a peroxidação dos AGPI (Halliwell, 1991). Esse sistema consiste de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase e a catalase; de micronutrientes, que incluem os

minerais como selênio, cobre, zinco, manganês e as vitaminas E, C e beta-caroteno (Hennekens & Gaziano, 1993). O primeiro meio de defesa natural são as metaloproteínas superóxidos dismutases (SOD) citoplasmática (contendo cobre e zinco) e mitocondrial (contendo manganês), que atuam acelerando a velocidade de dismutação do radical superóxido (Bast et al., 1991). A catalase é uma hemoproteína citoplasmática, que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio à água e a oxigênio, e a glutathione peroxidase (GPO) catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos a seus correspondentes álcoois às custas da conversão da glutathione reduzida à glutathione oxidada (Ferreira & Matsubara, 1997).

A vitamina E é um antioxidante natural, lipossolúvel, capaz de quebrar a reação em cadeia da peroxidação lipídica mediada por radicais livres em membranas celulares, prevenindo a formação de hidroperóxido (Jackson, 1994). A formação de peróxidos de lípidos resulta de uma reação em cadeia envolvendo a remoção de prótons de ácidos graxos insaturados, radicais livres intermediários que reagem com o oxigênio para formar peróxi e finalmente peróxidos lipídicos. A membrana celular é o sítio principal da ação de radicais livres derivados do oxigênio em função da presença de AGPI, por sua natureza fosfolipídica (Halliwell, 1991). Os radicais livres atacam as membranas biológicas que possuem elevado teor de AGPI, como as membranas dos lisossomos, levando a uma degradação dos tecidos. Por isso é conveniente a reposição dos AGPI, ao lado do uso de antioxidante como os tocoferóis (vitamina E) (Esterbauer et al., 1991). A vitamina E, representada na Figura 4, inibe a peroxidação lipídica pela varredura do radical peroxil (Halliwell, 1994).

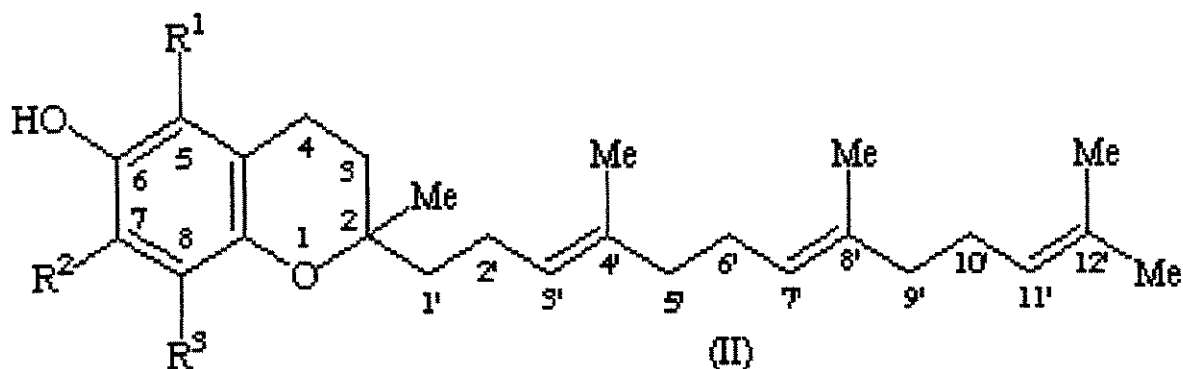


Figura 4. Estrutura química da vitamina E.

Fonte: Moss (1992).

Vários estudos mostraram os graves danos que a reatividade dos radicais livres podem causar às moléculas biológicas em algumas doenças, especialmente para o DNA, através da formação do radical hidroxil, que ocorre em todas as células aeróbicas, contribuindo para o desenvolvimento do câncer e do envelhecimento. O dano oxidativo dos lípidos, nas paredes dos vasos sanguíneos, leva ao desenvolvimento da aterosclerose e também à produção excessiva de radicais livres, que participam do dano nos tecidos, causando a artrite reumatóide e doenças inflamatórias do intestino, tais como Crohn e colite ulcerativa (Halliwell, 1994).

Estudos epidemiológicos têm observado que indivíduos com alto consumo ou altas concentrações no sangue de vitaminas antioxidantes tem de 20 a 40% menor risco de ter doenças cardíacas. A vitamina E inibe a oxidação da LDL-colesterol, que quando oxidada, acelera várias etapas de aterosclerose e dano endotelial (Buring & Hennekens, 1997).

De acordo com Saito et al. (1996), a suplementação dietética com

cápsulas de AGPI ω -3 e uma baixa quantidade de α -tocoferol podem diminuir as defesas antioxidantes normais. Contudo, as implicações danosas que a suplementação com AGPI ω -3 pode causar, sem vitamina E, têm sido omitidas por causa dos muitos benefícios que o AGPI ω -3 traz à saúde.

Em experimento descrito por Douillet et al. (1998), em que ratos diabéticos foram suplementados com selênio e vitamina E, concluiu-se que a suplementação teve um papel positivo na prevenção do estado oxidativo de AGPI ω -3 contido nos tecidos.

Para recomendar o consumo adequado de óleo de peixe, devem ser considerados a composição e os efeitos potencialmente nocivos do mesmo, com a deficiência de vitamina E, podendo resultar na oxidação excessiva dos AGPI ω -3. Para evitar tais prejuízos, tem sido sugerida a armazenagem em baixas temperaturas, embalagens em cápsulas gelatinosas e adição de antioxidantes (Herold & Kinzella, 1986). Os AGPI ω -3 são os ácidos graxos insaturados mais conhecidos e altamente sensíveis à autooxidação. Há dois aspectos para esse problema: a deterioração do sabor que ocorre na exposição do óleo de peixe refinado com o ar, sendo mais um problema tecnológico do que uma ameaça à saúde, visto que o odor repulsivo e o sabor tornarão o óleo inaceitável para o consumo humano. O óleo encapsulado é protegido do contato com o ar e é bastante estável, mas o controle de qualidade rigoroso é necessário para assegurar que o óleo não oxide antes da encapsulação. O outro aspecto relativo ao alto grau de insaturação do ω -3 refere-se à presença dos lípides na membrana celular após a sua absorção. Os AGPI são extremamente sensíveis ao ataque dos radicais livres que causam dano à estrutura e função

das membranas. O α -tocoferol age como um varredor de radicais livres e antioxidante biológico; portanto, é prudente aumentar o suplemento de vitamina E quando os óleos de peixe são consumidos (Budowski, 1988). Os antioxidantes podem ter um importante papel na prevenção de danos provocados pelos radicais livres aos tecidos, seja por interferência na formação de espécies reativas de oxigênio ou protegendo-os dos processos oxidativos (Diniz, 2000).

Alguns estudos têm demonstrado evidências de que a adição de antioxidantes à dieta resulta em benefícios para a saúde, como por exemplo: retardo do desenvolvimento de doenças relacionadas ao envelhecimento, proteção do organismo contra alterações genéticas e bioquímicas decorrentes da ação de radicais livres ou espécies reativas do oxigênio, redução do risco de doenças cardiovasculares e de câncer, aumentando a expectativa de vida ou ainda melhorando o desempenho físico de desportistas (Alessio, 1993; Weindruch, 1996; Kanter, 1998).

Nos últimos anos, um grande interesse tem sido dado ao potencial uso terapêutico de suplementação em vitamina E, no tratamento de doenças do sistema nervoso, particularmente as neurodegenerativas, como a doença de Parkinson e mal de Alzheimer (Vatassery et al., 1998).

Define-se antioxidante como “qualquer substância que, mesmo estando presente em baixas concentrações, reduz ou inibe significativamente a oxidação de substratos”. Com relação à defesa antioxidante, os organismos vivos têm um sistema complexo para controlar a produção e reduzir os danos

por radicais livres. O estado antioxidante seria refletido pelo balanço dinâmico entre os sistemas anti e pró-oxidantes. A identificação do equilíbrio entre essas substâncias no organismo vem sendo atualmente empregada para estimar o risco de dano oxidativo (Gutteridge, 1993; Papas, 1996).

Alguns mecanismos de defesa antioxidante estão envolvidos no controle da formação de radicais livres. Os componentes desse sistema podem ser classificados conforme determinadas características, tais como: de natureza endógena ou dietética, baseando-se na sua solubilidade, origem enzimática ou não enzimática, tamanho das moléculas, dentre outras características (Papas, 1996). Sua ação pode acontecer de diferentes formas: removendo o O_2 ou diminuindo as concentrações deste no local afetado; removendo os íons metálicos que catalisam as reações; removendo as substâncias chave ($O_2^{\bullet}$ e H_2O_2); eliminando os radicais livres como o $OH^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$, $RO_2^{\bullet}$; quebrando a cadeia de uma sequência iniciada; eliminando ou seqüestrando 1O_2 . Muitas substâncias antioxidantes podem ter mais do que um mecanismo de ação, mas provavelmente a interação entre elas seja mais eficiente na proteção antioxidante (Gutteridge, 1993; Joseph et al., 1998).

Dietas ricas em AGPI são consideradas hipocolesterolêmicas (Grundy & Denke, 1990), porém provocam a formação de lipoproteínas mais ricas em AGPI, que seriam mais susceptíveis à peroxidação e, em princípio, mais aterogênicas. Substâncias antioxidantes, entre elas a vitamina E, podem evitar a oxidação dessas lipoproteínas (Esterbauer et al., 1987; Parthasarathy et al., 1990; Frei & Gaziano, 1993; Frei, 1995). Segundo Hennekens & Gaziano (1993), o papel primário da vitamina E é interferir com a cadeia de

propagação dos radicais livres, na fase inicial da peroxidação lipídica. A vitamina E doa um hidrogênio aos radicais peróxilos, evitando assim a propagação. As várias formas da vitamina E não são idênticas na atividade antioxidante e biológica, sendo que o α -tocoferol apresenta a maior atividade antioxidante, enquanto que o δ -tocoferol somente tem 50% da atividade antioxidante, apesar de ser a principal forma na dieta humana (Kayden & Traber, 1993).

2.3 Ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) ômega-3 (ω -3)

A família dos AGPI ω -3 compreende o ácido α -linolênico (C18:3, ω -3) (Figura 5) do qual, por alongamento e dessaturação, são gerados os ácidos eicosapentaenóico (EPA) (C20:5, ω -3) (Figura 6) e docosahexaenóico (DHA) (C22:6, ω -3) (Figura 7), que são ácidos graxos com a primeira dupla ligação no terceiro carbono, a partir do carbono metílico terminal. O ácido α -linolênico é considerado ácido graxo essencial porque não pode ser sintetizado no organismo humano e deve ser fornecido através da dieta. Diferentemente de outros ácidos graxos que podem ser sintetizados a partir de macronutrientes no corpo, estes não podem ser fabricados endogenamente e podem ser supridos apenas pela dieta. A grande fonte do ácido α -linolênico reside nos animais marinhos, particularmente peixes, pois o fitoplankton e zooplankton com que se alimentam são ricos em AGPI de cadeia longa ω -3 (Belda & Pourchet-Campos, 1991). Os peixes que se encontram em uma escala superior da cadeia de alimentos marinhos incorporam os AGPI ω -3 e os alongam a ácidos graxos de 20 e 22 carbonos, contendo 4 ou até 6 duplas ligações por ação de enzimas específicas, que aumentam o número de duplas

ligações. Dessa maneira, os peixes concentram EPA e DHA, principalmente no tecido adiposo e órgãos viscerais. Portanto, quanto maior a gordura do peixe, maior é seu conteúdo de AGPI ω -3 (Valenzuela et al., 1993).

Quanto à importância nutricional dos AGPI, ficou demonstrado que a posição das duplas ligações relativas ao grupo metilo do final da cadeia de carbonos tem maior significado do que com relação ao grupo carboxila, como é a correta nomenclatura em química orgânica, o que levou à sugestão de numerar os átomos a partir do carbono terminal (CH_3) designado ômega, última letra do alfabeto grego. Esse tipo de numeração define a série ω à qual a molécula pertence, como, por exemplo, ao ω -3 (Figuras 5-7), ω -6, ω -9 (ácido linolênico, ácido linoléico e ácido oléico, respectivamente).

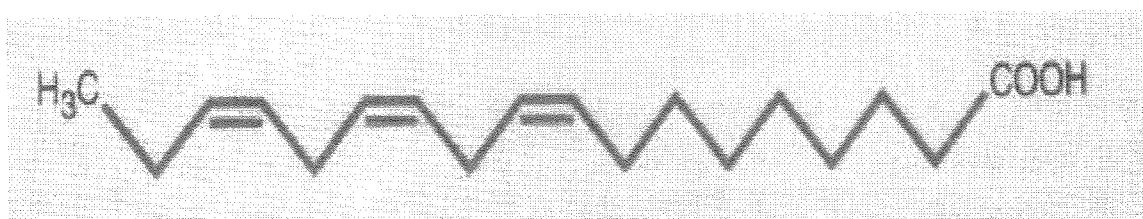


Figura 5. Estrutura do AGPI α -linolênico (C18:3, ω -3) – duplas ligações nos carbonos: 3,6,9.

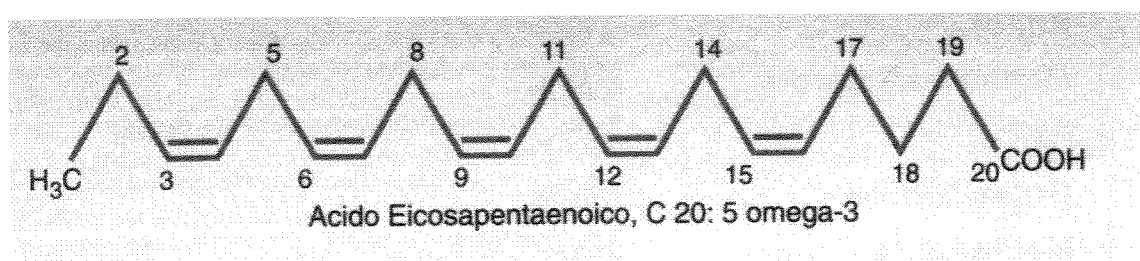


Figura 6. Estrutura do AGPI eicosapentaenóico (EPA) (C20:5, ω -3) - duplas ligações nos carbonos: 3,6,9,12,15.

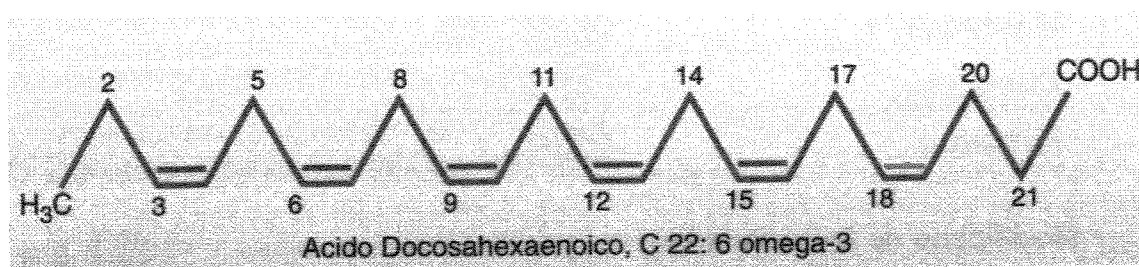


Figura 7. Estrutura do AGPI docosahexaenóico (DHA) (C22:6, ω -3) duplas ligações nos carbonos: 3,6,9,12,15,18.

Fonte: Valenzuela (1999).

Os primeiros estudos epidemiológicos, referentes aos efeitos dos AGPI ω -3 sobre a saúde, começaram na década de 70, época em que um grupo de investigadores dinamarqueses comparou a incidência de morte repentina por doença cardiovascular em dinamarqueses, como aquela dos esquimós da

Groelândia. A taxa de óbitos para os esquimós era significativamente mais baixa. Os pesquisadores concluíram que a diferença podia estar relacionada com o tipo de gordura ingerida pelos esquimós, ao invés da quantidade. A dieta dos esquimós apresentava um teor tão ou mais alto de gordura do que a dos dinamarqueses, mas o peixe e os mamíferos marinhos, na dieta dos esquimós, continham cinco vezes mais AGPI ω -3 do que a dieta dinamarquesa (Bang et al., 1971).

O óleo de peixe contém AGPI ω -3, responsável pela redução na agregação de plaquetas nas veias, diminuindo a viscosidade do plasma sangüíneo (Herold & Kinzella, 1986). EPA e DHA agem no organismo por estímulo de suspensões de plaquetas e trombina inibindo o metabolismo do ácido araquidônico, que tem efeito antagônico aos do AGPI ω -3 no organismo humano. Além disso, no tecido vascular, o EPA é metabolizado em prostaciclina que tem potencial para inibir a agregação das plaquetas e aumentar a vasodilatação (Kinzella et al., 1990).

Os efeitos anti-agregatórios, atribuídos ao EPA, são mediados por alterações no padrão da produção de eicosanóides depois do consumo de óleos de peixe. A suplementação com óleos de peixe tem demonstrado reduzir os níveis de tromboxano A_2 (TXA₂) e prostaciclina PGI₂. Tem sido proposto que o EPA, presente no óleo de peixe, compete com o ácido araquidônico ao nível da ciclooxigenase e, assim, resulta na síntese de TXA e PGI, que tem propriedades fracamente pró-agregantes, prevenindo a agregação plaquetária (Frias, 1995).

Entre as várias propriedades biológicas dos AGPI ω -3, a ação redutora de lípides foi a primeira a ser reconhecida. A descoberta dos efeitos hipocolesterolêmicos foi relatada por Bronte-Stewart et al. (1956). Esses resultados foram novamente confirmados por Keys et al. (1957), que compararam a eficácia do óleo de peixe, rico em AGPI ω -3, na redução do nível de colesterol plasmático, em relação aos óleos de milho e girassol, ricos em AGPI ω -6.

Numerosas investigações, em humanos e animais, demonstraram o papel da dieta com AGPI na pressão sangüínea. A queda da pressão sangüínea, pela dieta, pode ser modulada por respostas do sistema pressórico às substâncias vasoconstrictoras circulantes e à habilidade contráctil intrínseca do músculo liso vascular (Hime, 2000). Segundo Fitzgerald et al. (1983), uma queda na pressão sangüínea, sistólica e diastólica, foi observada em homens saudáveis que receberam 15g de óleo de peixe como suplemento, durante 4 semanas. Quando os suplementos foram interrompidos, a pressão sangüínea retornou a linha de base após um mês.

Chee et al. (1990) relataram que o uso de cápsulas de AGPI ω -3 tem sido associado à diminuição no nível de triacilglicerol plasmático. Além disso, as populações que consomem dietas ricas em óleo de peixe têm uma incidência reduzida de doença cardiovascular. O mecanismo de inibição da secreção de triacilglicerol pelos AGPI ω -3 de cadeia longa ocorre, provavelmente, através da redução da via de síntese do triacilglicerol.

Em vários estudos, quantidades crescentes de óleo de peixe ou

concentrado de AGPI ω -3 foram testados em humanos. As estimativas da dose diária mínima de AGPI ω -3, para reduzir significativamente os níveis de triacilglicerol, variou de 7g no caso do concentrado de DHA ingerido pelos voluntários saudáveis durante 4 meses (Bronsgest-Shoute et al., 1981), para 2g em experimento de 3 meses com pacientes hiperlipêmicos (Simons et al., 1985).

Nas pesquisas realizadas por Sanders & Hochland (1983) e Mortensen et al. (1983), comparou-se o uso do suplemento de óleo de peixe e do óleo vegetal em homens saudáveis, durante 2 e 4 semanas, respectivamente. Nas duas pesquisas, o AGPI ω -3 foi fornecido em cápsulas contendo 18% de EPA e 12% de DHA, enquanto as cápsulas com óleo vegetal continham uma mistura de óleo de milho e óleo de oliva. Os autores mostraram que o colesterol sérico total permaneceu inalterado, mas, nos indivíduos que receberam suplemento com óleo de peixe, houve uma queda nos triacilgliceróis sérico de 26% durante 4 semanas, junto com uma queda de VLDL-colesterol. Os níveis de HDL-colesterol aumentaram significativamente após o tratamento com AGPI ω -3. As cápsulas de óleo vegetal não afetaram o nível de triacilglicerol. Mouri et al. (1984) estudaram a influência do consumo de óleo marinho sobre os níveis de lípides, α -tocoferol e peroxidação lipídica no sangue e no fígado de ratos, e concluíram que os níveis de colesterol e triacilglicerol diminuíram comparado com o grupo que recebeu óleo de milho.

De acordo com Saynor (1984), os níveis de triacilglicerol foram reduzidos em 48% e o colesterol 8%, quando foi usado suplemento de óleo de

peixe em 16 pessoas hiperlipêmicas, comparado com um grupo controle, que recebeu suplementação com uma mistura de óleo de milho e óleo de oliva e tiveram uma redução de 13% de triacilglicerol; a mudança no colesterol não foi significativa, durante dois meses.

Em seres humanos normais ou obesos com hipercolesterolemia, a administração de AGPI ω -3 reduziu os valores de colesterol e triacilglicerol no sangue. A razão desse efeito parece estar ligada à célula hepática. O fígado normalmente secreta triacilglicerol e colesterol, mas reduz o ritmo dessa secreção, principalmente de triacilglicerol, quando os AGPI ω -3 estão presentes (Harris et al., 1983). Foi demonstrado que o EPA pode causar diminuição da síntese do triacilglicerol hepático, através da redução da atividade das principais enzimas responsáveis pela síntese de NADPH (enzima málica e desidrogenase-6-fosfato) (Nossen et al., 1986).

Os eicosanóides são grupos de compostos biologicamente ativos de vinte carbonos (C20), que incluem as prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos. Todos eicosanóides são derivados do ácido araquidônico. São sintetizados a partir dos AGPI componentes dos fosfolípidos das membranas celulares. São hormônios parácrinos, substâncias que agem somente nas células próximas onde são sintetizados. Estão envolvidos na função reprodutiva, na inflamação, febre, dor associada à lesão ou doença, formação das plaquetas e regulação da pressão arterial, secreção de ácidos gástricos e uma variedade de outros processos importantes na saúde ou doença humana (Nelson & Cox, 2000).

A administração de AGPI ω -3 fornece considerável alteração nos processos inflamatórios e alérgicos, sendo resultado da inibição na formação de compostos mediadores da inflamação (Drevon, 1992). Os AGPI ω -3 também têm função nas reações inflamatórias e na resposta imunológica. O leucotrieno LTB_4 , produzido do ácido araquidônico, é fortemente quimiotático, fazendo com que os leucócitos se acumulem no local de inflamação. Contrastando com isto, o leucotrieno LTB_5 , produzido do EPA, é muito menos potente do que o LTB_4 . O consumo de óleos de peixe resulta na melhora de algumas condições inflamatórias, tais como artrite reumatóide e lúpus eritematoso. Novos estudos sugerem que os AGPI ω -3 suprimem a síntese de interleucina e fator de necrose tumoral, o que se correlaciona melhor com a melhora clínica do que com a produção de leucotrieno (Voss, 1994).

O ω -3 é incorporado na membrana da célula e influencia sua fluidez, a função de receptor, a atividade enzimática, as citocinas e a produção de eicosanóides (Nelson & Cox, 2000). A suplementação oral com ω -3 de óleo de peixe, em sujeitos saudáveis, decresce a produção de citocinas pró-inflamatórias interleucinas-2 e interleucinas-1 em monócitos isolados e o fator de necrose tumoral.

Efeitos biológicos dos ω -3 são caracterizados pela diminuição na aderência de plaquetas, diminuição nos níveis de triacilgliceróis, menos do colesterol, melhora na fluidez da membrana (eritrócitos) e mudanças no endotélio vascular resultantes da produção de compostos antiinflamatórios. O ω -3 promove, também, a formação da prostaglandinas da série E1,

estimuladora da liberação de somatotropina (Fett et al., 2001). As plaquetas são células sanguíneas que desempenham um importante papel na integridade vascular, controlando a permeabilidade das arteríolas. Apresentam uma tendência natural de se agregarem e aderirem à parede dos vasos sanguíneos. Essa tendência é controlada pela produção de tromboxana TXA_2 , a partir de $C20:4 \omega-6$, por enzimas existentes nessas células. Se a síntese de TXA_2 for excessiva, pode ocorrer vasoconstricção e as plaquetas tendem a formar agregados, ou trombos, que podem bloquear as artérias, causando a trombose coronária ou cerebral. Felizmente essa tendência em resposta a TXA_2 é continuamente contrabalanceada pela produção de prostaciclina (PGI_2), que também são sintetizadas a partir de $C20:4 \omega-6$, só que por enzimas existentes nas células endoteliais da parede vascular. PGI_2 promove vasodilatação, mínima adesão plaquetária e desagregação, sendo portanto antitrombótica. Esse mecanismo hemostático é criticamente importante na manutenção da integridade e funcionamento do sistema vascular; seu desequilíbrio, ao contrário, pode conduzir à trombose e sangramento. A elucidação dessas inter-relações demonstra um efeito específico dos AGPI na etiologia da trombose e doenças isquêmicas do coração. Também neutrófilos, macrófagos e mastócitos contêm lipoxigenases e, portanto, sintetizam hidroxi ácidos graxos biologicamente ativos e leucotrienos. Os leucotrienos exercem atividade quimiotática, sobre os neutrófilos e macrófagos, podendo causar sua aderência ao endotélio arterial, bem como aumentar a permeabilidade vascular. Esses efeitos têm apontado para um papel pró-inflamatório dos leucotrienos. A Tabela 1 apresenta as propriedades fisiológicas dos principais eicosanóides derivados do ácido araquidônico e ácido eicosapentaenóico (EPA) (Vannucchi & Campana, 1991).

Tabela 1. Propriedades fisiológicas dos principais eicosanóides derivados do ácido araquidônico (AA) e ácido eicosapentaenóico (EPA).

Local de ação	AA (C20:4 ω -6)	EPA (C20:5 ω -3)
Plaquetas	TXA ₂	TXA ₃
	Pró agregatório	Antiagregatório
	Vasoconstrictora	Não-vasoconstrictora
Células endoteliais	PGI ₂	PGI ₃
	Antiagregatório	Antiagregatório
	Vasodilatadora	Vasodilatadora
Granulócitos	LTB ₄	LTB ₅
Macrófagos	Fortemente	Fracamente
Monócitos	Quimiotático	Quimiotático

Fonte: Drevon (1992).

Os AGPI ω -3 apresentam participações relevantes nos processos de carcinogênese de diversos órgãos e tecidos, como o de cólon, fígado, endométrio, próstata, mamário e outros. Um alto consumo de AGPI ω -3 tem sido associado à diminuição da incidência, crescimento e dispersão de diversos tumores experimentais (Bagga et al., 1997). Yam et al. (1997), utilizando o óleo de peixe em ratos com crescimento de tumor e metástase de carcinoma no pulmão, relataram uma diminuição significativa do tumor primário e na taxa de mortalidade nos animais suplementados com óleo de peixe, enquanto que, nos animais que receberam óleo de soja, não houve diferença significativa.

Uma cápsula de 1000mg de ácidos graxos fornece geralmente 180mg de

EPA e 120mg de DHA. Todavia, ainda não se estabeleceu a exigência diária de ácidos graxos em seres humanos, e esta varia dependendo da idade e estado nutricional de cada indivíduo. Considera-se que a ingestão de uma ou duas cápsulas por dia fornecem suficiente quantidade de EPA e DHA para satisfazer os padrões ótimos de saúde (Valenzuela et al., 1993).

As recomendações nutricionais, proferidas pelo International Food Information Council (1989), indicam que o consumo diário de lipídios não deve ultrapassar 30% de ingestão calórica total, sendo 10% de gorduras saturadas, 10% de gorduras monoinsaturadas e 10% de gorduras poliinsaturadas para redução do risco desenvolvimento de doenças cardiovasculares, hipertensão, obesidade, entre outras.

A proporção entre gorduras poliinsaturadas e saturadas (razão P/S), é de extrema importância em estudos de dietas, pois um excesso de ácido linoléico irá competir pelas dessaturases, comprometendo o teor de ω -3, tendo como possível consequência uma baixa produção de EPA (Harris, 1997), ou seja, quando ocorrem níveis insuficientes de AGPI no consumo alimentar, o organismo tem que sintetizá-los a partir de seus homólogos, o que pode provocar um desequilíbrio nas proporções entre as diferentes séries. Por essa razão, recomenda-se manter uma proporção de 6:1 a 10:1 entre as séries ω -6 e ω -3 (COI, 1997). Entretanto, Staessen et al. (1998) chamaram a atenção para a inadequação de dietas que levam em conta teores em separado de lipídios, relação P/S, ácidos graxos saturados, ω -6 e ω -3 ingeridos, informando que esses teores devem ser analisados de forma correlacionada.

Foram determinadas, por várias instituições, as recomendações para ingestão de ω -3, obedecendo a sua proporção, com ω -6 para adultos (Tabela 2). O total de ácidos graxos, na dieta diária, é baseado nas informações nutricionais e níveis de ácidos graxos observados em pacientes com deficiência de ω -3 após suplementação.

Tabela 2. Recomendações para ingestão de AGPI ω -3.

Órgãos			Recomendações
British Nutrition Foundation (BNF)			0,5% da ingestão diária de energia. Isso corresponde a uma ingestão diária de aproximadamente 1250mg de EPA/DHA.
Committee on Medical Aspects of Food Policy (COMA)			Ingestão diária de 215mg EPA/DHA.
The Danish Ministry of Health (DMH)			35g diárias de peixe de espécies diferentes; calculando os níveis de ω -3 em 35g de peixes, teremos uma ingestão diária aproximada de 300mg de EPA/DHA.
German Nutrition Society			1-2 porções de peixes por semana, o que corresponde a uma ingestão diária aproximada de 350-700mg de EPA/DHA.
International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids			Consumo diário de 650mg de EPA/DHA. Mínimo de 220mg EPA/DHA.

Fonte: Ilha (1999).

Enzimas chamadas dessaturases estão envolvidas no processo de transformação dos ácidos graxos essenciais. Essas enzimas introduzem insaturações na molécula, sendo que a dessaturação inicial é feita pela Δ 6-dessaturase, e os ácidos graxos essenciais somados ao ácido oléico

competem por ela. A afinidade desses compostos pela enzima é na seguinte ordem: $18:3 > 18:2 > 18:1$. Como $18:3$ é menos comum na dieta, a reação costuma acontecer preferencialmente com o $18:2$ (Pacchioni, 1999). A Figura 8 mostra o caminho das mudanças que ocorrem a partir do ácido α -linolênico até alguns de seus importantes metabólitos.

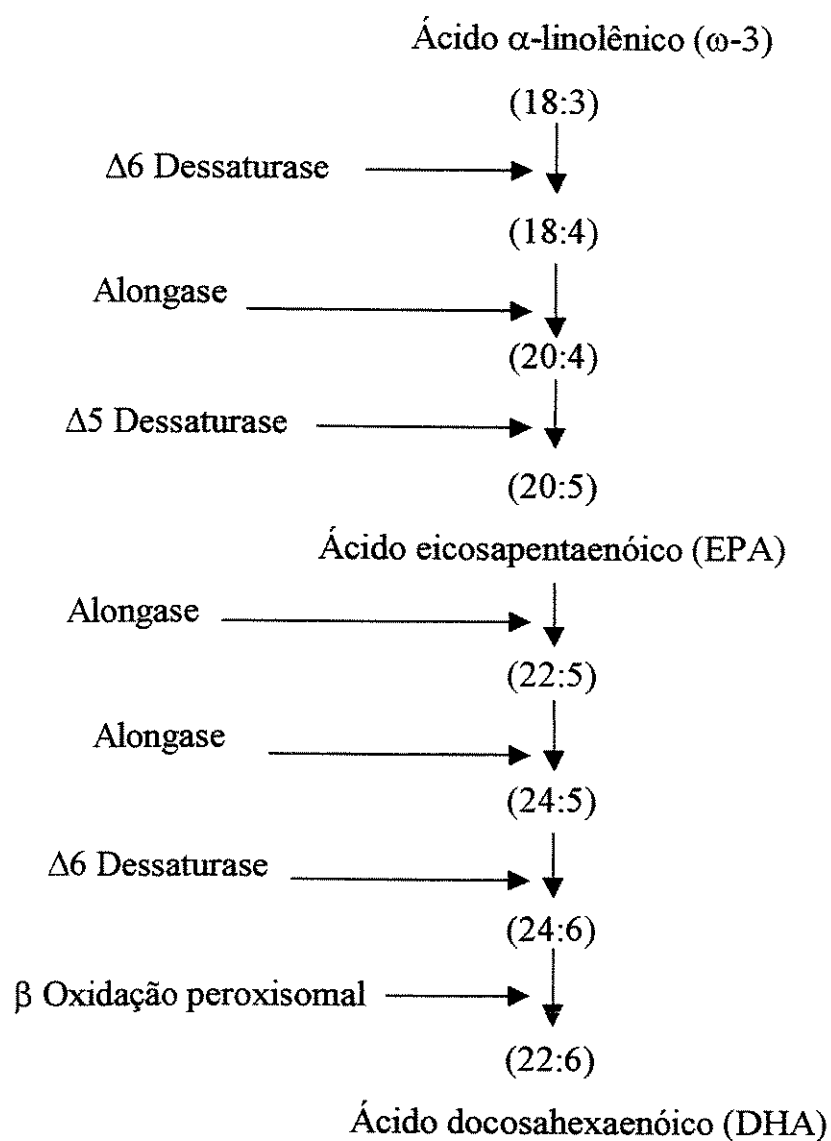


Figura 8. Esquema do metabolismo na formação dos AGPIs ω -3 EPA e DHA.

Fonte: Ewin (1997).

De acordo com Frias (1995), os AGPI ω -3 aparecem, nos lipídios dos tecidos, dentro de 1 – 2 dias, e suas concentrações nos fosfolipídios aumentam modestamente com uma alimentação contínua. Porém, os AGPI ω -3 são rapidamente depletados da maioria dos tecidos (dentro de 1 semana), quando ocorre a cessação da alimentação rica nesse ácido graxo. Por isso, para se beneficiar dos efeitos dos AGPI ω -3, deve-se consumir diariamente uma quantidade suficiente, evitando-se assim a depleção nos lipídios do tecido e, conseqüentemente, as doenças cardiovasculares.

Schechtman (1989) relatou os benefícios à saúde provenientes de diferentes efeitos dos AGPI ω -3: a) propriedades de diminuição de lipídios séricos e hepáticos; b) diminuição na formação de VLDL e aumento da HDL; c) melhoria das funções de membrana: fluidez, flexibilidade, permeabilidade, retina (acuidade visual) e cérebro (aprendizagem, desempenho e comportamento); d) efeitos de eicosanóides: diminuição da aterosclerose, aumento da resposta imunológica e da coagulação; e) efeitos combinados: redução do risco de câncer e diabetes.

Portanto, a suplementação de AGPI ω -3, visando efeitos benéficos, tem sido contestada por algumas pesquisas, uma vez que os AGPI ω -3 são especialmente susceptíveis aos processos oxidativos, induzindo a formação de compostos indesejáveis como radicais livres, peróxidos, hidroperóxidos e outros produtos secundários e terciários de oxidação, e com isso prejuízo à saúde. Alerta-se, com isso, que fazendo uso de suplementação com AGPI ω -3, a mesma deve ser associada a antioxidantes para proteção na oxidação lipídica ao nível celular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material



Utilizaram-se suplementos à base de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) ômega-3 (ω -3), contendo ou não vitamina E. A quantidade do suplemento de ácidos AGPI ω -3 foi calculada de acordo com a posologia dos fármacos, a serem utilizados, indicada no rótulo da embalagem, que recomenda de 1 a 2 cápsulas ao dia, onde cada cápsula da **marca A** contém 1000 mg de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (EPA: 180 mg e DHA: 120 mg) com vitamina E, e, da **marca B**, cada cápsula contém 500 mg (EPA: 90 mg e DHA: 50 mg) sem vitamina E. Foi administrada 1 ou 2 cápsulas que são, respectivamente, a posologia mínima e a máxima por dia para a **marca A** (com 60 mg de vitamina E) e, para a **marca B**, (sem vitamina E) foram administradas 2 ou 4 cápsulas que são, respectivamente, a posologia mínima e a máxima por dia. Os animais foram suplementados durante 45 dias consecutivos por via oral. Foi utilizado suplemento de vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol).

3.1.2 Animais para experimentação

Utilizaram-se ratos Wistar, albinos, machos, recém-desmamados (21-23 dias), com peso médio de $46,8 \pm 2,6$ g para o *primeiro ensaio biológico*, e $52,3 \pm 1,2$ g para o *segundo ensaio biológico*, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, SP.

3.2 Métodos Analíticos

3.2.1 Determinação do índice de peróxido (IP)

A determinação do índice de peróxido do soro, fígado e dieta seguiu o método oficial da AOAC (1975a), baseado na oxidação de iodeto de potássio pelas substâncias oxidantes presentes na amostra e assumindo-se que sejam peróxidos. Pesou-se cerca de 0,1 g de amostra e acrescentaram-se 30 ml da solução de ácido acético:clorofórmio (3:2); em seguida, adicionou-se 0,5 ml da solução saturada de iodeto de potássio e 30 ml de água destilada, e foi feita titulação com tiosulfato de sódio 0,02N.

3.2.2 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico do soro, fígado e dieta seguiu a metodologia proposta por Sinnhuber & Yu (1977): pesou-se cerca de 0,20 g de amostra tecidual e 0,05 a 0,15 g de óleos ou extratos lipídicos; em seguida acrescentaram-se 5 ml de ácido 2-tiobarbitúrico a 0,1N, 5 ml de água destilada, 5 ml de ácido clorídrico a 0,6N e 10 ml da solução de ácido tricloroacético; conectou-se a um condensador e destilou-se ao refluxo por 30 minutos, em banho-maria fervente; após esse período, acrescentaram-se 70 ml de ácido clorídrico 0,6N e continuou-se o refluxo por mais 10 minutos; posteriormente, a solução foi filtrada e feita a leitura a 535 nm, em espectrofotômetro Beckman, modelo DU-70.

3.2.3 Determinação de vitamina E (tocoferóis totais)

A determinação de vitamina E (tocoferóis totais) do soro, fígado e dieta seguiu o método de Contreras-Guzmán & Strong (1982), feita, no mínimo, em triplicata para cada amostra; utilizou-se, em média, 0,5 g de amostra; adicionaram-se 8 ml de heptano, 2,5 ml de ácido ascórbico e 2,5 ml de hidróxido de potássio alcoólico; para o padrão, adicionaram-se 8ml da solução padrão de α -tocoferol, 2,5 ml de ácido ascórbico e 2,5 ml de hidróxido de potássio alcoólico; e, para o branco, adicionaram-se 8 ml de heptano puro, 2,5 ml de ácido ascórbico e 2,5 ml de hidróxido de potássio alcoólico. Transferiram-se, para o tubo de ensaio, 5 ml da camada de heptano e adicionaram-se 5 ml de etanol a 70%; a seguir, transferiram-se, para o tubo de ensaio, 3 ml da camada superior e adicionaram-se 5 ml do reagente de complexação; deixou-se sedimentar e transferiram-se, para o tubo de ensaio, 3 ml da camada inferior e adicionou-se 0,5 ml de etanol puro. O branco foi usado para calibrar o aparelho e, em seguida, no padrão e nas amostras, foram lidas as absorbâncias a 545 nm, em espectrofotômetro Beckman, modelo DU-70.

3.2.4 Determinação da composição de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (AGPI) ômega-3 (ω -3)

Para a determinação da composição de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (AGPI) ômega-3 (ω -3) do soro, fígado e dieta seguiu-se o método de Hartman & Lago (1973), onde é feita a saponificação do óleo e conversão dos ácidos graxos em ésteres metílicos.

Pesaram-se 100 mg da amostra, adicionaram-se 4 ml do reagente de saponificação (hidróxido de sódio 0,5N); agitou-se e aqueceu-se a 100°C por 3 a 5 minutos, até se obter uma solução transparente; a seguir foi feito um resfriamento até temperatura ambiente; adicionaram-se 5 ml do reagente de esterificação (cloreto+ácido sulfúrico+metanol – BF₃), novamente agitou-se e aqueceu-se por 2 minutos, em água fervente; resfriou-se em água corrente, adicionaram-se 3-4 ml da solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), agitou-se em seguida e adicionaram-se 6-8 ml de heptano ou éter de petróleo; agitou-se novamente, deixou-se em repouso até separação das fases; transferiu-se, para o tubo de ensaio, a fase superior (fase orgânica) e guardou-se, na geladeira, o sobrenadante (ésteres metílicos). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram analisados por cromatografia a gás, em um cromatógrafo Varian 3600, com detector de ionização de chama (FID), coluna J & W Scientific, filme 0,25 µm. A temperatura programada da coluna foi de 170°C a 210°C, na taxa de 1°C por minuto, a temperatura do detector foi de 250°C, do injetor 250°C e a vazão de gás de arraste de 1,0 ml/min. O volume da amostra foi de 1,0 ml, solvente benzina de petróleo, gás de arraste hidrogênio. Os ácidos graxos ômega-3 foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos componentes da amostra, com os padrões (Sigma Chemical Company) e quantificados pelo percentual da área, com um registrador microcomputador digital (programa Varian Star 4.5).

3.2.5 Extração e determinação lipídica

O procedimento para extração e determinação do conteúdo lipídico do fígado, soro e dieta foi determinado pelo método de Bligh & Dyer (1959),

sendo a amostra homogeneizada com uma mistura de clorofórmio, metanol e água na proporção de 1:2:0,8 e 2:2:1,8 antes e após a diluição, respectivamente. Uma alíquota da amostra de extração contendo os lipídios foi evaporada até peso constante, em estufa a 100⁰C, e os resultados calculados como percentagem do peso úmido da amostra.

3.2.6 Determinação do colesterol total sérico e hepático e de suas frações (LDL, HDL e VLDL) e dos triacilgliceróis

Para avaliação do perfil lipídico, utilizou-se o sangue dos animais, que foi coletado por punção cardíaca, em três tempos (T0, T1 e T2), após jejum de 16 horas. As amostras de sangue individuais foram deixadas em banho-maria, a 37°C, por 30 minutos e, em seguida, centrifugadas a 1.300 x/g por 15 minutos. Foi recolhido o soro, para as análises de lípides totais (para o primeiro ensaio biológico), colesterol total, HDL-colesterol e triacilgliceróis, que foram dosados através de *kits* enzimáticos comerciais LABTEST (Labcenter, Campinas – SP). O princípio da metodologia do *kit* enzimático, utilizado para a determinação de lípides totais, baseia-se na reação dos lípides do soro com ácido sulfúrico, formando o “íon carbonium”, que reage com o grupamento carbonil ativado do reagente de cor, produzindo um complexo de cor rósea, que é estabilizado por ressonância e tem absorção máxima em torno de 535 nm. No caso da determinação do colesterol total, utilizou-se uma reação de oxidação catalisada pelo colesterol oxidase, após hidrólise dos ésteres de colesterol, monitorada a 540 nm; foi adicionado 1 ml de reagente ao soro, incubando-se a 37°C por 10 minutos; uma concentração de colesterol de 200 mg/dl foi usada como padrão. A determinação do HDL-colesterol, no

sobrenadante, ocorre pelo ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio; após a centrifugação, o HDL-colesterol foi determinado pelo reagente enzimático para colesterol total. A determinação de triacilgliceróis era feita com uma mistura de varsol, isopropanol e ácido sulfúrico, havendo separação em fases com recuperação total dos triacilgliceróis na fase não polar (superior), ficando os fosfolípides, glicose e bilirrubina na fase polar (inferior), juntamente com as proteínas; os triacilgliceróis extraídos são saponificados a glicerol, que é oxidado a formaldeído e este é medido através da formação de um complexo dehidrolutidina amarelo (reação de Hantzsch).

Os fígados foram retirados para a dosagem de colesterol total e dos triacilgliceróis. A técnica utilizada para a extração dos lípides foi a de Haug & Hostmark (1987), onde era pesada cerca de 0,1 g de fígado, adicionados 5 ml de isopropanol e, em seguida, agitação por 1 minuto; o extrato obtido foi mantido por 2 dias a uma temperatura de 4°C e posteriormente centrifugado por 10 minutos a 1000 x/g; as alíquotas dos sobrenadantes foram então analisadas enzimaticamente, através dos *kits* comerciais LABTEST (Labcenter, Campinas – SP).

As concentrações de VLDL-colesterol e LDL-colesterol foram calculadas segundo as fórmulas de Friedewald et al. (1972):

$$\text{VLDL-colesterol} = \frac{\text{triacilgliceróis}}{5}$$

5

$$\text{LDL-colesterol} = \text{colesterol total} - (\text{HDL-colesterol} + \text{VLDL-colesterol}).$$

3.2.7 Determinação de proteína bruta na caseína e nas dietas experimentais

O nitrogênio total da caseína e das dietas experimentais foi determinado pelo método semimicro Kjeldahl (AOAC, 1975b), utilizando-se como catalisador, na fase da digestão, o dióxido de titânio (Williams, 1973) e 6,38 como fator de conversão de nitrogênio para a proteína da caseína.

3.2.8 Determinação de umidade

Foi feita, por secagem das amostras (fígado), em estufa, a 105°C, até peso constante (AOAC, 1990). Os sólidos totais foram obtidos pela diferença entre o peso total da amostra e o conteúdo em umidade.

3.3 Ensaio Biológicos

3.3.1 Animais e dietas experimentais

Para o *primeiro ensaio biológico* (Figura 9), foram utilizados 60 ratos machos e albinos, da linhagem Wistar, recém-desmamados. Inicialmente os 60 animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos experimentais, 10 animais por grupo; os mesmos permaneceram por 3 dias em adaptação, recebendo dieta basal AIN93-G e, ao final desse período, foi feito o alinhamento do peso, retirando 2 animais por grupo, que foram sacrificados para análise do sangue e fígado; esta análise foi considerada “valor de

referência” e denominada “Tempo 0”. Permaneceram 48 animais (8 animais por grupo), dos quais, após 30 dias de experimento, foram retirados 4 animais por grupo, onde foi feita análise de sangue e tecido hepático denominado “Tempo 1”, e, após 45 dias, foi feita mais uma análise, denominada “Tempo 2”, nos animais restantes, por grupos, para as avaliações em todos os tempos do perfil lipídico, sérico e hepático; dos lípides totais; dos níveis de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3; da dosagem de vitamina E, e das determinações do índice de peróxido e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

A partir dos resultados obtidos, no *primeiro ensaio biológico*, optou-se por realizar um *segundo ensaio biológico* (Figura 10), com algumas modificações: aumento do número de ratos de 60 para 80 animais; um período de crescimento, onde os animais receberam dieta não purificada de fórmula fechada (Nuvital®) por 8 dias, para obter maior quantidade de amostra (soro e fígado) necessária para as análises; retirou-se, do protocolo, os grupos que receberam 1 g de AGPI com e sem vitamina E, tendo em vista, aos resultados encontrados nesses grupos experimentais, que não foram significativos, ficando apenas 4 grupos experimentais ao invés de 6 grupos, como no *primeiro ensaio biológico*. Inicialmente os 80 animais foram pesados e submetidos a um período de aclimação ao ambiente em gaiolas de crescimento individuais, durante 8 dias em dieta não purificada de fórmula fechada (Nuvital®) para ganho de peso; em seguida foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, 16 animais por grupo; os mesmos permaneceram por 4 dias em adaptação recebendo dieta basal AIN93-G e, ao final desse período, foi feito o alinhamento do peso, retirando

4 animais por grupo, que foram sacrificados para análise do sangue e fígado; essa análise foi considerada como “valor de referência” e denominada “Tempo 0”. Permaneceram 64 animais (16 animais por grupo), dos quais, após 30 dias de experimento, foram retirados 8 animais por grupo, onde foi feita análise de sangue e fígado, denominado “Tempo 1”; e, após 15 dias, foi feita mais uma análise, denominada “Tempo 2”, nos animais restantes, por grupo, para as avaliações em todos os tempos do perfil lipídico, sérico e fígado, dos lípides totais, dos níveis de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, da dosagem de vitamina E, e das determinações do índice de peróxido e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Os animais foram suplementados por gavagem durante 45 dias consecutivos.

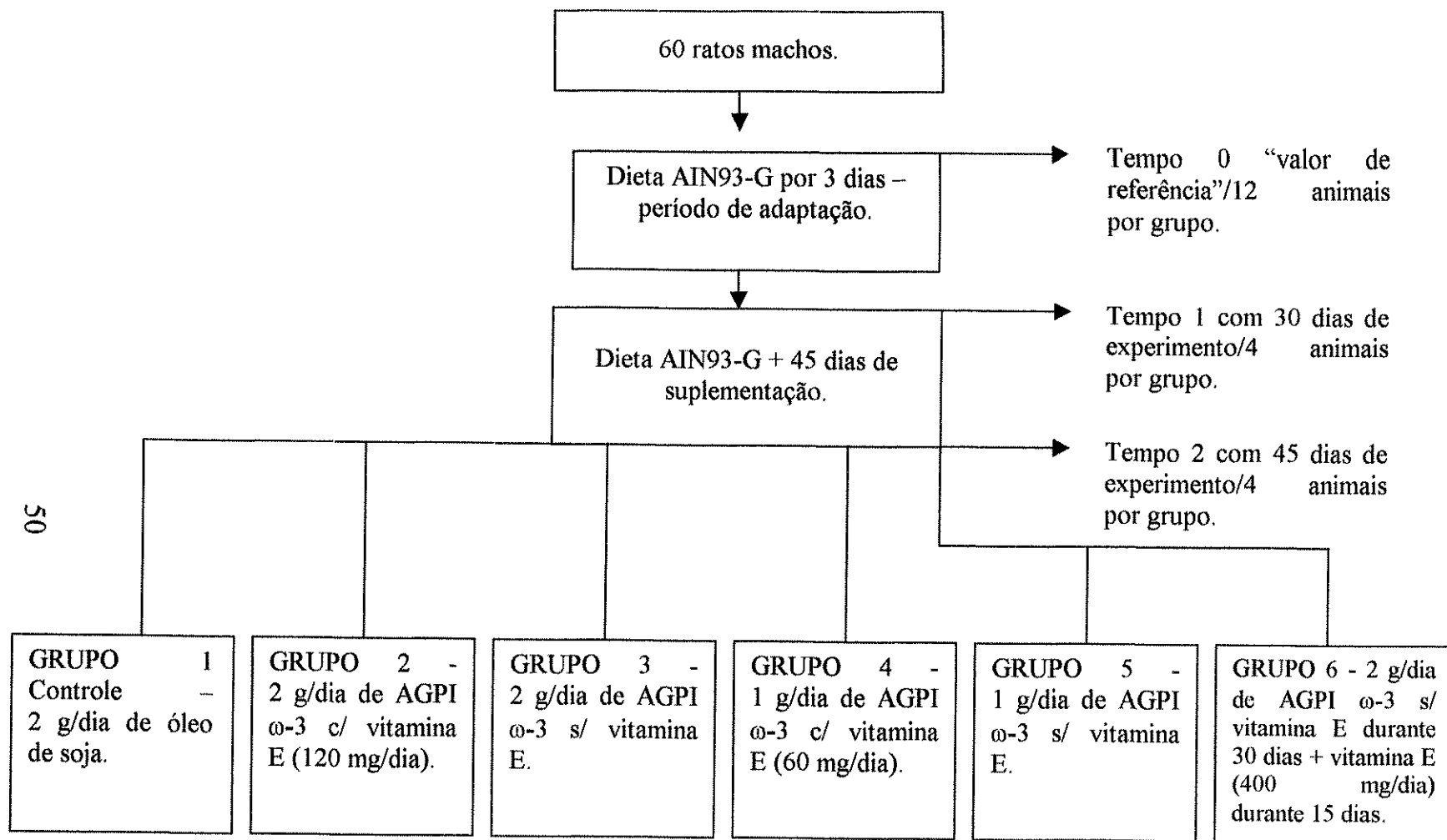


FIGURA 9. Esquema do delineamento experimental do *primeiro ensaio biológico*.

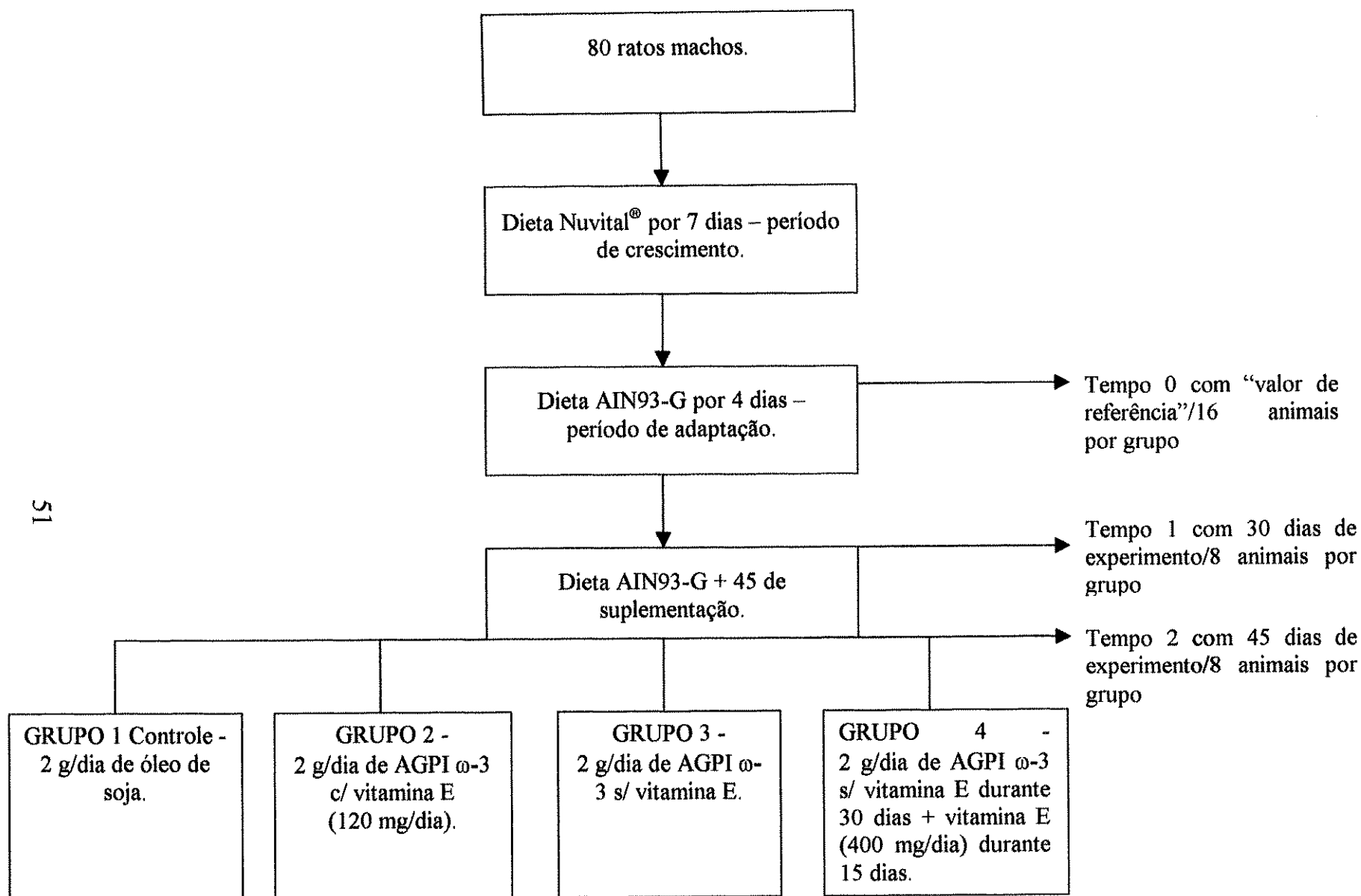


FIGURA 10. Esquema do delineamento experimental do *segundo ensaio biológico*.

As dietas purificadas foram formuladas segundo o “American Institute of Nutrition” (Reeves et al., 1993), dieta AIN-93G (Tabela 3), e, nas Tabelas 4 e 5, estão expostas às composições das misturas mineral e vitamínica, respectivamente, para ratos em crescimento, contendo caseína como fonte protéica; as dietas foram modificadas para conter 12% de proteína bruta (Pellet & Young, 1980; Santidrián, 1988; Goena, 1989). O consumo de dieta foi monitorado durante todo o período experimental.

Tabela 3. Composição da dieta basal AIN-93G conforme Reeves et al., (1993).

Ingredientes	g/kg de dieta
Amido de milho	397,486
Amido de milho dextrinizado	132,000
Sacarose	100,000
Caseína ($\geq 85\%$ de proteína)	200,000
Óleo de soja	70,000
Fibra (Celulose)	50,000
Mistura Mineral (AIN-93G-MX) Tabela 2	35,00
Mistura Vitamínica (AIN-93G-VX) Tabela 3	10,00
L-Cistina	3,00
Bitartarato de Colina – 41,1% de colina	2,500
Terbutilidroquinona	0,014
Total de dieta	1000,000

A caseína, M. Cassab[®], utilizada continha somente 80,0±0,3% de proteína bruta. A fração carboidrato da dieta foi fornecida por amido de milho Maizena[®]; o amido de milho dextrinizado por Corn Products Brasil[®], a sacarose por União[®], o óleo de soja Soya[®], a fibra celulose microfina Arbocel 1-290, a L-cistina Synth C 1.027.01AE, o bitartarato de colina Sigma C 1629, o terbutilidroquinona Sigma B 9161, a mistura mineral (AIN-93G-MX) (Tabela 2) e a mistura vitamínica (AIN-93G-VX) (Tabela 3). Todos os compostos das rações foram selecionados de acordo com os padrões da AIN-93G (Reeves et al., 1993). O percentual de proteína na dieta foi de 12%.

Tabela 4. Mistura mineral AIN-93G-MX (Reeves et al., 1993).

Ingredientes	g/Kg
Elementos minerais essenciais:	-
Carbonato de cálcio anidro – 40,04% Ca	357,00
Fosfato de potássio monobásico – 22,76% P; 28,73% K	196,00
Cloreto de sódio – 39,34% Na; 60,66% Cl	74,00
Sulfato de potássio – 44,87% K; 18,39% S	46,60
Citrato de potássio, tri-K, monoidratado – 36,16% K	70,78
Óxido de magnésio – 60,32% Mg	24,00
Citrato férrico – 16,5% Fe	6,06
Carbonato de zinco – 52,14% Zn	1,65
Carbonato de manganês – 47,79% Mn	0,63
Carbonato de cobre – 57,47% Cu	0,30
Iodeto de potássio – 59,3% I	0,01
Selenito de sódio anidro – 41,79% Se	0,01025
Paramolibidato de amônio, 4H ₂ O – 54,34% Mo	0,00795
Elementos minerais potencialmente benéficos:	-
Meta-silicato de sódio, 9H ₂ O – 9,88% Si	1,45
Sulfato de potássio crômico, 12H ₂ O – 10,42% Cr	0,275
Cloridrato de lítio – 16,38% Li	0,0174
Ácido bórico – 17,5% B	0,0815
Fluoreto de sódio – 45,24% F	0,0635
Carbonato de níquel – 45% Ni	0,0066
Vanadato de amônia – 43,55% V	0,0318
Sacarose em pó (q.s.p.)	221,026

Tabela 5. Mistura vitamínica AIN-93G-VX (Reeves et al., 1993).

Vitaminas	g/Kg
Ácido nicotínico	3,000
Pantotenato de cálcio	1,600
Piridoxina – HCL	0,700
Tiamina – HCL	0,600
Riboflavina	0,600
Ácido fólico	0,200
D-Biotina	0,020
Cianocobalamina (B 12) (0,1% em manitol)	2,500
Acetato de all-rac- α -tocoferol (E)* (500 UI/g)	15,00
Palmitato de all-trans-retinol (A) (500.000 UI/g)	0,800
Colicalciferol (D3) (400.000 UI/g)	0,250
Filoquinona (vitamina K)	0,075
Sacarose em pó (q.s.p.)	974,655

A mistura vitamínica, constante na formulação da dieta AIN-93G, foi mantida na íntegra, uma vez que o consumo diário de vitamina E foi de 0,003g/dia em média, o que representou uma quantidade muito pequena com relação à quantidade de vitamina E fornecida por suplementação.

Os animais foram mantidos em gaiolas de crescimento individuais, com água e alimentação à vontade, por um período de quarenta e cinco dias. A temperatura e umidade relativa foram $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 50-60%, respectivamente, com ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais foram sacrificados, após jejum

de 16 horas, para coleta de sangue por punção cardíaca e retirados os fígados, de acordo com as normas laboratoriais em vigor adotadas pelo Laboratório de Ensaio Biológicos do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, obtendo-se, assim, amostras de sangue e fígados denominadas: Tempo 0, Tempo 1 e Tempo 2.

As amostras de fígado foram liofilizadas de acordo com o seguinte procedimento: após a retirada dos fígados, congelou-se os fígados em nitrogênio líquido e acondicionou-se em bandejas, sendo, em seguida, levados para o liofilizador por 28 horas; após esse período, os fígados foram homogeneizados individualmente e acondicionados em recipiente próprio com identificação por rato, por grupo experimental e por tempo de suplementação, sendo armazenados em freezer a -25°C até as análises. Os resultados das análises dos fígados estão apresentados em base úmida, uma vez que foi feita a determinação da umidade dos mesmos. O percentual encontrado de umidade nos fígados foi de $66,7 \pm 1,2 \%$.

3.3.2 Primeiro ensaio biológico

Os grupos experimentais, em estudo, foram divididos de acordo com a quantidade de suplemento e marca, com e sem vitamina E:

GRUPO 1 - Controle - suplementação por gavagem com 2 g/dia de óleo de soja;

GRUPO 2 – Suplementação por gavagem com 2 g/dia de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 da **marca A**, com vitamina E (120 mg/dia);

GRUPO 3 - Suplementação por gavagem com 2 g/dia de ácidos graxos

poliinsaturados ômega-3 da **marca B**, sem vitamina E;

GRUPO 4 - Suplementação por gavagem com 1 g/dia de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 da **marca A**, com vitamina E (60 mg/dia);

GRUPO 5 - Suplementação por gavagem com 1 g/dia de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 da **marca B**, sem vitamina E;

GRUPO 6 - Suplementação por gavagem com 2 g/dia de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 da **marca B**, sem vitamina E por um período de 30 dias e, posteriormente, durante 15 dias, suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo não houve sacrifício de animais no "Tempo 1".

3.3.3 Segundo ensaio biológico

Os grupos experimentais, em estudo, foram divididos de acordo com a quantidade de suplemento e marca, com e sem vitamina E:

GRUPO 1 - Controle - suplementação por gavagem com 2 g/dia de óleo de soja;

GRUPO 2 – Suplementação por gavagem com 2 g/dia de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 da **marca A**, com vitamina E (120 mg/dia);

GRUPO 3 - Suplementação por gavagem com 2 g/dia de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 da **marca B**, sem vitamina E;

GRUPO 4 – Suplementação por gavagem com 2 g/dia de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 da **marca A**, com vitamina E por um período de 30 dias e, posteriormente, durante 15 dias, suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo não houve sacrifício de animais no "Tempo 1".

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA) do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

3.4 Avaliação do ganho de peso dos animais e do consumo de dieta

A curva ponderal de peso dos animais, alimentados com dieta AIN-93G, foi elaborada com o peso no início do experimento (P_0), após o período de 3 dias de adaptação (P_1), e a cada semana até o 45^o dia de experimento para o *primeiro ensaio biológico*, e, no *segundo ensaio biológico*, utilizou-se o peso no início do experimento (P_0), após uma semana que os animais receberam dieta não purificada de fórmula fechada (Nuvital[®]) para ganho de peso, depois de um período de 4 dias de adaptação às dietas experimentais (P_1) e a cada semana até o 45^o dia de experimento (P_2). A quantidade de dieta ingerida foi determinada pela diferença de peso entre a oferta, as sobras e as perdas. A água era trocada e os bebedouros lavados a cada 2 dias, durante o controle do consumo alimentar e pesagem dos animais.

3.5 Análise Estatística

Os dados foram avaliados pelos testes estatísticos ANOVA e de Tukey para confronto de médias. Para tanto foi utilizado o Software “Statistica: Basic Statistics and Tables[®]”, ao nível mínimo de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização química dos produtos utilizados nos ensaios biológicos

Os resultados apresentados, na Tabela 6, mostram as análises realizadas dos produtos utilizados nos ensaios biológicos, mais particularmente dieta AIN93-G, suplementos à base de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) ômega-3 (ω -3), **marca A e B**, e suplemento de vitamina E, **marca C**.

Tabela 6. Caracterização química dos produtos utilizados nos ensaios biológicos.

Amostras	Lípides totais (%)	Vitamina E (mg de Tocoferóis/100g)	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	Índice de peróxido (mEq/Kg)	AGPI ômega-3 (mg/g)
Dieta AIN93-G	7,0 $\pm$ 0,1	7,4 $\pm$ 007	0,3 $\pm$ 0,06	0,5 $\pm$ 0,04	-
AGPI com vitamina E (60 mg)* marca A (1000 mg)*	-	624,8 $\pm$ 0,02	0,7 $\pm$ 0,04	0,6 $\pm$ 0,06	EPA: 200,0 DHA: 121,3
AGPI sem vitamina E marca B (500 mg)*	-	6,9 $\pm$ 0,08	0,7 $\pm$ 0,05	0,6 $\pm$ 0,09	EPA: 90,5 DHA: 52,6
Vitamina E marca C	-	400,0**	0,5 $\pm$ 0,03	0,6 $\pm$ 0,02	-

TBARS – mg de dialdeídomalônico/kg de amostra;

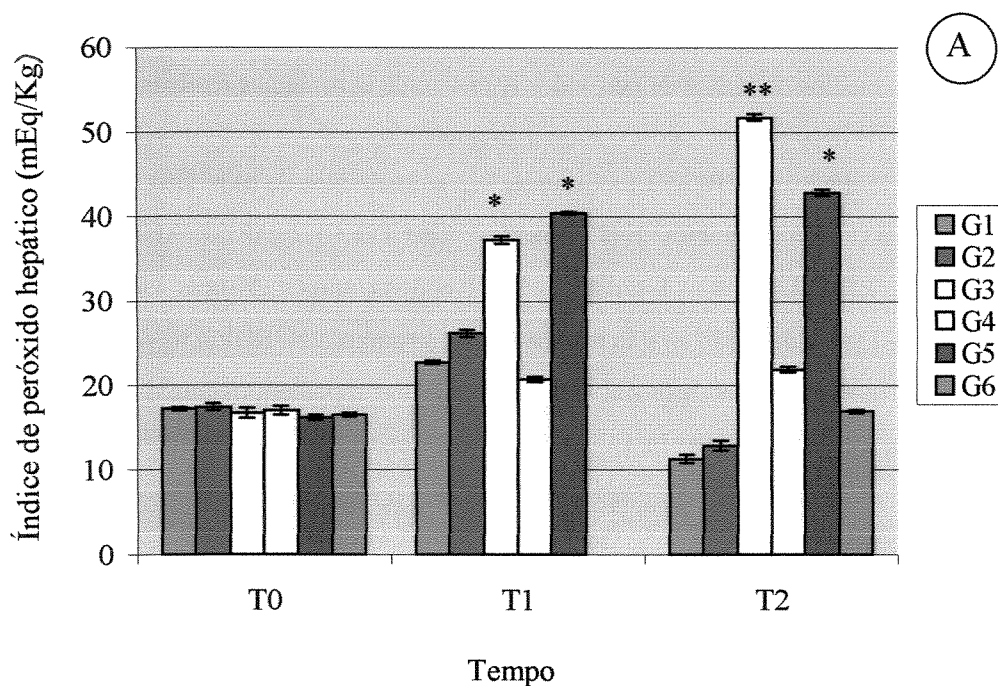
*valor de rótulo por cápsula;

**o valor considerado foi o de rótulo em mg de acetato de DL- α -tocoferol.

4.2 Primeiro ensaio biológico

4.2.1 Índice de peróxido (IP) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) hepáticos

A Figura 11 (A-B) apresenta as concentrações do índice de peróxido (IP) e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) hepáticos respectivamente.



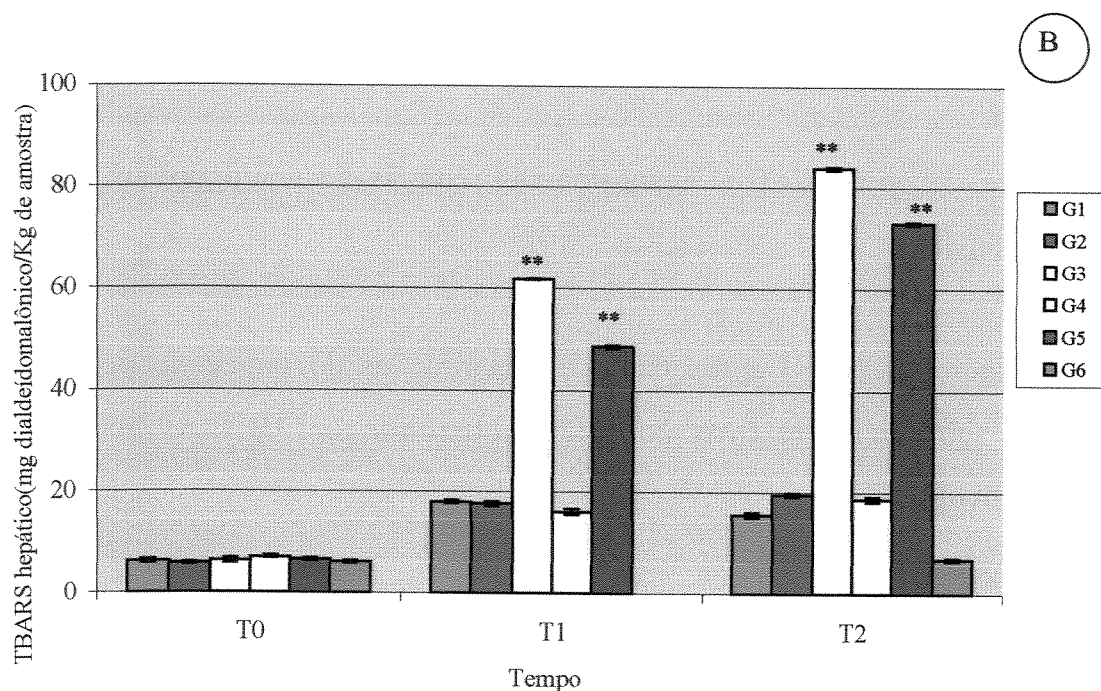


Figura 11 (A-B). Teores médios de índice de peróxido (IP) (A) e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (B) hepáticos de ratos Wistar, suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) em: GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 4 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A**, com vitamina E (60 mg/dia); GRUPO 5 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 6 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E, por um período de 30 dias e posteriormente durante 15 dias, suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$, em relação ao valor de referência ao longo dos tempos.

4.2.2 Vitamina E (tocoferóis totais) hepática

O resultado dos teores de vitamina E (tocoferóis totais) hepáticos estão apresentados na Tabela 7, onde se observou um aumento significativo ($p < 0,05$), nos Tempos 1 e 2, em relação ao Tempo 0; sendo os resultados mais em destaque os do Grupo 2, no Tempo 2; e os do Grupo 6, no Tempo 2, que

apresentaram também diferença significativa de todos os outros grupos experimentais, nos Tempos 1 e 2.

Tabela 7. Teores médios de vitamina E (tocoferóis totais) hepáticos de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).

Grupos	Tempos	Vitamina E (tocoferóis totais) hepática (mg de Tocoferol/100g)
VALOR DE REFERÊNCIA	T0 (3 DIAS)	0,5±0,1 ^a
GRUPO 1 – CONTROLE – Óleo de soja – 2 g/dia	T1 (30 DIAS)	1,5±0,1 ^b
GRUPO 2 – AGPI ω-3 - 2 g/dia marca A c/ vitamina E	T1	1,7±0,1 ^b
GRUPO 3 – AGPI ω-3 - 2 g/dia marca B s/ vitamina E	T1	1,1±0,1 ^c
GRUPO 4 – AGPI ω-3 - 1 g/dia marca A c/ vitamina E	T1	0,9±0,1 ^c
GRUPO 5 – AGPI ω-3 - 1 g/dia marca B s/ vitamina E	T1	1,2±0,2 ^c
GRUPO 6 – AGPI ω-3 - 2 g/dia marca B s/ vitamina E + vitamina E (400 mg/dia) marca C	T1	-
GRUPO 1 – CONTROLE – Óleo de soja – 2 g/dia	T2 (45 DIAS)	1,5±0,2 ^b
GRUPO 2 – AGPI ω-3 - 2 g/dia marca A c/ vitamina E	T2	3,0±0,1 ^d
GRUPO 3 – AGPI ω-3 - 2 g/dia marca B s/ vitamina E	T2	1,2±0,1 ^c
GRUPO 4 – AGPI ω-3 - 1 g/dia marca A c/ vitamina E	T2	1,8±0,1 ^b
GRUPO 5 – AGPI ω-3 - 1 g/dia marca B s/ vitamina E	T2	1,6±0,1 ^b
GRUPO 6 – AGPI ω-3 - 2 g/dia marca B s/ vitamina E + vitamina E (400 mg/dia) marca C	T2	4,8±0,1 ^e

^{a, b, c, d, e} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05).

4.2.3 Teores médios dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (%) hepático

Na Tabela 8, estão demonstrados os teores médios dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (%) nos fígados. Somente esses ácidos mostraram expressivas variações, com diferença significativa ($p < 0,05$), ao longo da suplementação, com AGPI ω -3: palmítico (16:0) $0,6 \pm 0,4$; esteárico (18:0) $0,4 \pm 0,2$; oléico (18:1) $0,3 \pm 0,1$; AGPI ω -3: α -linolênico (18:3) $0,6 \pm 0,2$; eicosapentaenóico (EPA) (20:5 ω -3) $0,3 \pm 0,1$; docosapentaenóico (22:5) $0,4 \pm 0,2$; docosahexaenóico (DHA) (22:6 ω -3) $0,2 \pm 0,1$, para o Tempo 0, os teores médios encontrados para os 5 grupos experimentais, no Tempo 1, foram os seguintes: palmítico $2,2 \pm 0,5$; esteárico $1,9 \pm 0,5$; oléico $1,2 \pm 0,3$; AGPI ω -3: α -linolênico $1,7 \pm 0,5$; EPA: $1,2 \pm 0,5$; docosapentaenóico: $1,1 \pm 0,5$; DHA $1,3 \pm 0,3$, e, para o Tempo 2, os resultados médios entre os 6 grupos experimentais foram os seguintes: palmítico $2,8 \pm 0,8$; esteárico $1,8 \pm 0,6$; oléico $1,7 \pm 0,6$; AGPI ω -3: α -linolênico $2,6 \pm 0,8$; EPA: $1,2 \pm 0,3$; docosapentaenóico $1,5 \pm 0,5$; DHA $1,6 \pm 0,2$.

Tabela 8. Teores médios de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (AGPI) encontrados no fígado (%) de ratos Wistar, nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) de suplementação com AGPI ω -3, com e sem vitamina E.

Ácidos graxos	Tempo 0 (3 DIAS)	Tempo 1 (30 DIAS)					Tempo 2 (45 DIAS)					
	-	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
16:0	0,6±0,4 ^a	2,0±0,5 ^b	2,3±0,7 ^b	2,0±0,5 ^b	2,1±0,4 ^b	2,5±0,5 ^b	2,3±0,7 ^b	2,6±0,7 ^b	2,4±0,8 ^b	2,5±0,9 ^b	2,1±0,4 ^b	2,2±0,6 ^b
18:0	0,4±0,2 ^a	2,7±0,2 ^b	1,7±0,5 ^c	1,6±0,3 ^{cf}	1,8±0,7 ^{cd}	1,7±0,6 ^c	1,9±0,6 ^d	1,6±0,5 ^{cf}	1,1±0,5 ^e	1,5±0,6 ^f	1,3±0,3 ^f	1,4±0,4 ^f
18:1	0,3±0,1 ^a	1,1±0,4 ^b	1,3±0,3 ^{bc}	1,2±0,6 ^b	1,1±0,2 ^b	1,4±0,2 ^c	1,2±0,4 ^b	1,7±0,6 ^d	1,4±0,6 ^c	1,0±0,1 ^b	1,9±0,7 ^e	1,2±0,5 ^b
18:2n-6	0,7±0,2 ^a	1,0±0,6 ^b	0,8±0,4 ^a	0,9±0,4 ^b	0,4±0,1 ^c	0,7±0,3 ^a	0,5±0,3 ^{cd}	0,4±0,1 ^c	0,8±0,4 ^a	0,6±0,3 ^{ad}	0,5±0,8 ^c	0,6±0,4 ^{ad}
20:3n-6	0,2±0,1 ^a	0,6±0,3 ^b	0,7±0,2 ^{bc}	0,5±0,2 ^{bc}	0,4±0,2 ^c	0,8±0,4 ^{de}	0,9±0,2 ^d	0,7±0,4 ^{be}	0,6±0,2 ^b	0,4±0,1 ^c	0,8±0,2 ^{bd}	0,7±0,4 ^{be}
20:4n-6	0,3±0,1 ^a	0,3±0,1 ^a	0,8±0,4 ^b	0,6±0,3 ^c	0,8±0,3 ^b	0,5±0,2 ^{cd}	0,6±0,3 ^c	0,4±0,1 ^d	0,8±0,3 ^b	0,6±0,2 ^c	0,7±0,3 ^b	0,9±0,2 ^b
22:4n-6	0,5±0,3 ^a	0,9±0,3 ^b	0,6±0,3 ^a	0,4±0,1 ^a	0,7±0,3 ^b	0,4±0,1 ^a	0,8±0,4 ^b	0,6±0,2 ^a	0,4±0,1 ^a	0,9±0,5 ^b	0,6±0,1 ^a	0,5±0,1 ^a
18:3n-3	0,6±0,2 ^a	1,0±0,7 ^b	2,0±0,4 ^c	1,8±0,5 ^d	1,5±0,4 ^e	2,1±0,7 ^c	1,0±0,7 ^b	2,6±0,7 ^f	2,8±0,7 ^B	2,5±0,7 ^f	2,2±0,8 ^c	2,0±0,4 ^c
20:5n-3	0,3±0,1 ^a	0,8±0,4 ^a	1,6±0,5 ^c	0,9±0,3 ^b	1,4±0,5 ^c	1,5±0,8 ^e	0,9±0,5 ^b	1,5±0,6 ^c	1,3±0,6 ^d	1,5±0,8 ^c	1,2±0,4 ^d	1,3±0,3 ^d
22:5n-3	0,4±0,2 ^a	0,4±0,2 ^a	1,3±0,6 ^b	1,2±0,4 ^b	1,5±0,4 ^d	1,3±0,6 ^b	0,6±0,2 ^c	1,2±0,5 ^b	1,0±0,4 ^b	1,4±0,6 ^d	1,6±0,5 ^{de}	1,7±0,5 ^e
22:6n-3	0,2±0,1 ^a	0,3±0,1 ^a	1,3±0,2 ^b	1,4±0,1 ^{bc}	1,7±0,2 ^d	1,6±0,4 ^d	0,7±0,1 ^e	1,2±0,1 ^b	1,5±0,3 ^c	1,7±0,2 ^d	1,6±0,2 ^d	1,3±0,1 ^b

GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 4 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A**, com vitamina E (60 mg/dia); GRUPO 5 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 6 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E, por um período de 30 dias e posteriormente durante 15 dias, suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1.

^{a, b, c, d, e, f, g} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

4.2.4 Lípidos totais hepáticos

A Tabela 9 mostra os resultados encontrados na determinação de lípidos totais hepáticos, onde se observa um aumento dos teores dos Tempos 1 e 2, em relação ao Tempo 0, com diferença significativa ($p < 0,05$), em especial o Grupo 1 e o Grupo 3 no Tempo 2, sendo que os demais grupos experimentais apresentaram valores que não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) nos Tempos 1 e 2.

Tabela 9. Teores médios de lípides totais hepáticos de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).

Grupos	Tempos	Lípides totais hepáticos (%)
VALOR DE REFERÊNCIA	T0 (3 DIAS)	5,4±0,3 ^a
GRUPO 1 – CONTROLE – Óleo de soja – 2 g/dia	T1 (30 DIAS)	7,2±0,3 ^b
GRUPO 2 – AGPI ω-3 c/ vitamina E – 2 g/dia marca A	T1	7,4±0,2 ^b
GRUPO 3 – AGPI ω-3 s/ vitamina E – 2 g/dia marca B	T1	7,2±0,3 ^b
GRUPO 4 – AGPI ω-3 c/ vitamina E – 1 g/dia marca A	T1	7,2±0,3 ^b
GRUPO 5 – AGPI ω-3 s/ vitamina E – 1 g/dia marca B	T1	7,3±0,3 ^b
GRUPO 6 – AGPI ω-3 s/ vitamina E – 2 g/dia marca B + vitamina E (400 mg/dia) marca C	T1	-
GRUPO 1 – CONTROLE – Óleo de soja – 2 g/dia	T2 (45 DIAS)	9,0±0,1 ^c
GRUPO 2 – AGPI ω-3 c/ vitamina E – 2 g/dia marca A	T2	7,7±0,1 ^{bc}
GRUPO 3 – AGPI ω-3 s/ vitamina E – 2 g/dia marca B	T2	8,2±0,1 ^{de}
GRUPO 4 – AGPI ω-3 c/ vitamina E – 1 g/dia marca A	T2	7,6±0,2 ^{bd}
GRUPO 5 – AGPI ω-3 s/ vitamina E – 1 g/dia marca B	T2	7,4±0,1 ^b
GRUPO 6 – AGPI ω-3 s/ vitamina E – 2 g/dia marca B + vitamina E (400 mg/dia) marca C	T2	7,3±0,1 ^b

^{a, b, c, d, e} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05).

No *primeiro ensaio biológico*, não foram realizadas análises de vitamina E, índice de peróxido, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e determinação dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 no sangue, devido à insuficiência de amostra.

4.2.5 Perfil lipídico sérico

A Figura 12 mostra a concentração de lípidos totais séricos (mg/dL), não tendo sido observada diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos experimentais e entre os tempos de suplementação T0, T1 e T2.

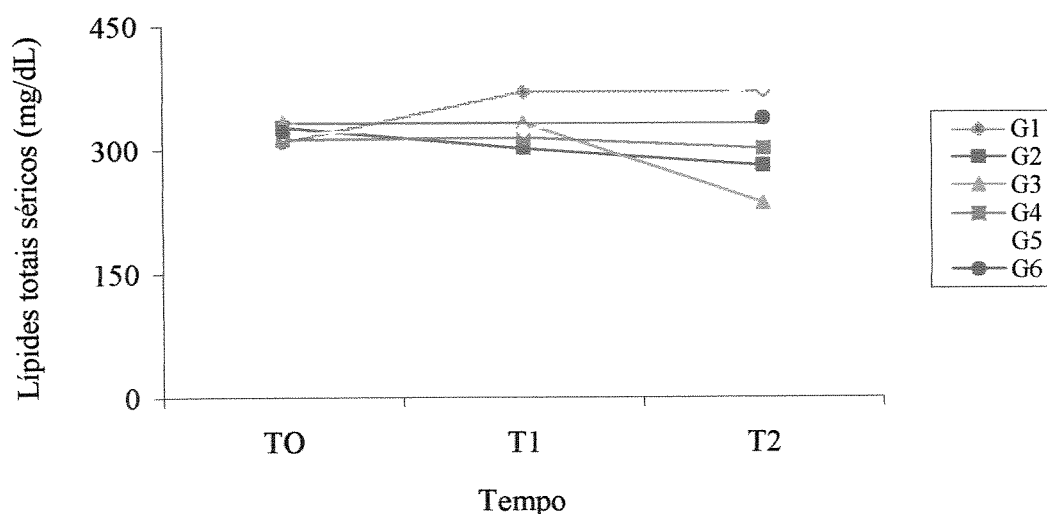


Figura 12. Teores médios de lípidos totais séricos (mg/dL) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) em: GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 4 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A**, com vitamina E (60 mg/dia); GRUPO 5 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 6 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E, por um período de 30 dias e posteriormente durante 15 dias, suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1.

Os teores de colesterol total sérico (mg/dL), apresentados na Figura 13, mostram um aumento no Tempo 1, com relação ao Tempo 0, e uma posterior redução no Tempo 2, para todos os grupos experimentais, praticamente voltando aos valores do Tempo 0.

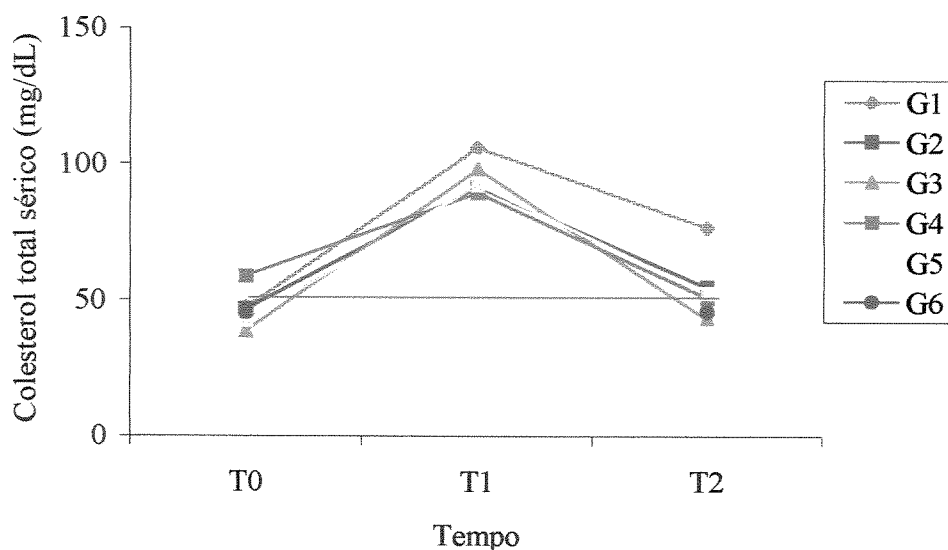


Figura 13. Teores médios de colesterol total sérico (mg/dL) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) em: GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 4 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A**, com vitamina E (60 mg/dia); GRUPO 5 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 6 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E, por um período de 30 dias e posteriormente durante 15 dias, suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1.

No que se refere aos teores de HDL-colesterol sérico (mg/dL) (Figura 14), apenas o Grupo 1 apresentou valores mais elevados ($p < 0,05$) do que os demais grupos nos Tempos 1 e 2.

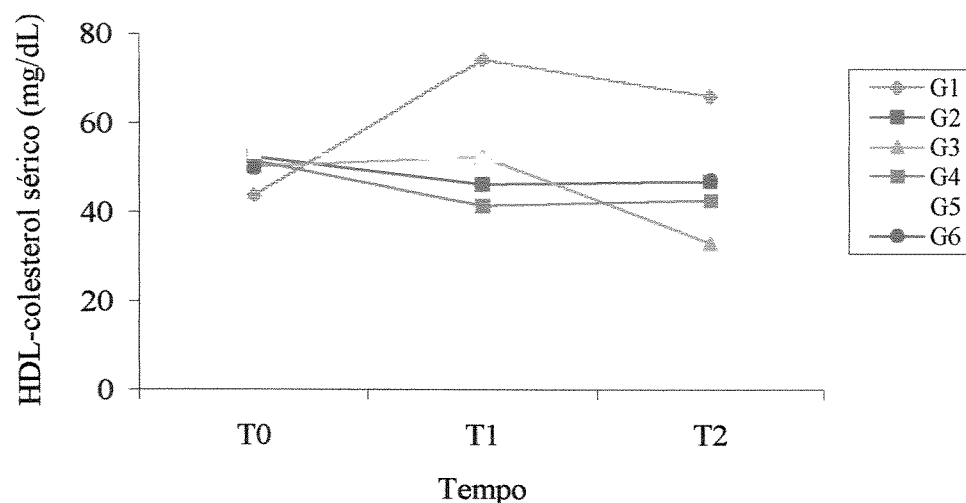


Figura 14. Teores médios de HDL-colesterol sérico (mg/dl) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) em: GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 4 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A**, com vitamina E (60 mg/dia); GRUPO 5 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 6 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E, por um período de 30 dias e posteriormente durante 15 dias, suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1.

Na Figura 15, estão demonstrados os resultados dos teores de LDL-colesterol sérico (mg/dl), em que ocorreu uma diminuição nos níveis no Tempo 2 com relação aos Tempos 0 e 1, à exceção do Grupo 5, no qual, observou-se um pequeno aumento, mas não significativo, dos valores em relação aos Tempos 0 e 1 ($p > 0,05$).

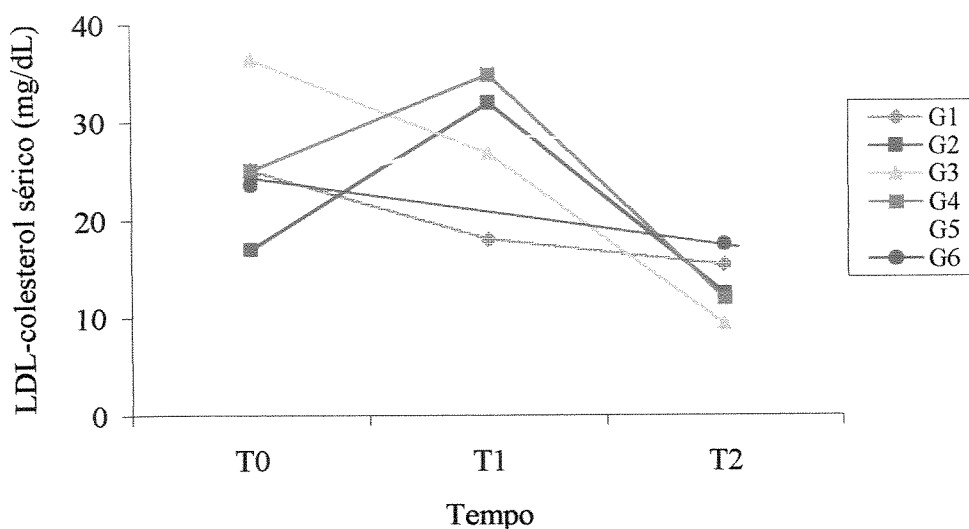


Figura 15. Teores médios de LDL-colesterol sérico (mg/dl) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) em: GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 4 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A**, com vitamina E (60 mg/dia); GRUPO 5 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 6 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E, por um período de 30 dias e posteriormente durante 15 dias, suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1.

Quanto aos teores de VLDL-colesterol séricos (mg/dl) (Figura 16), não ocorreu variação significativa dos teores nos 3 Tempos 0, 1 e 2, com exceção do Grupo 5, que apresentou valores maiores ($p < 0,05$) com relação ao Tempo 0.

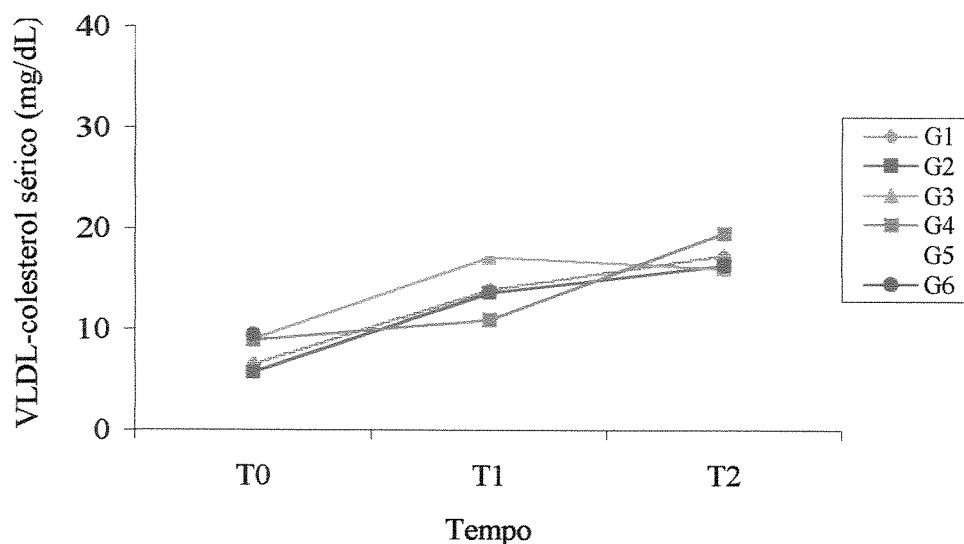


Figura 16. Teores médios de VLDL-colesterol sérico (mg/dL) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) em: GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 4 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A**, com vitamina E (60 mg/dia); GRUPO 5 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 6 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E, por um período de 30 dias e posteriormente durante 15 dias, suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1.

Pode-se observar, na Figura 17, que os teores de triacilgliceróis séricos (mg/dL), à semelhança dos teores de VLDL-colesterol séricos (Figura 16), não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) entre os 3 Tempos 0, 1 e 2, com exceção do Grupo 5, cujos valores aumentaram significativamente ($p < 0,05$) no Tempo 2, em relação aos Tempos 0 e 1.

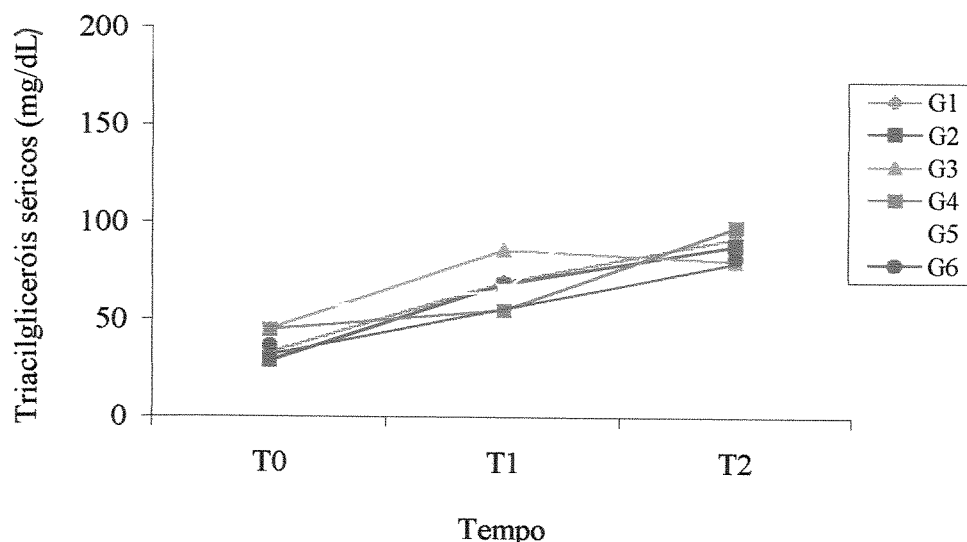


Figura 17. Teores médios de triacilgliceróis séricos (mg/dL) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) em: GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 4 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A**, com vitamina E (60 mg/dia); GRUPO 5 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 6 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E, por um período de 30 dias e posteriormente durante 15 dias, suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1.

4.2.6 Perfil lipídico hepático

A Figura 18 mostra os teores de colesterol total hepático (mg/g), não sendo encontrada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais nos tempos de suplementação.

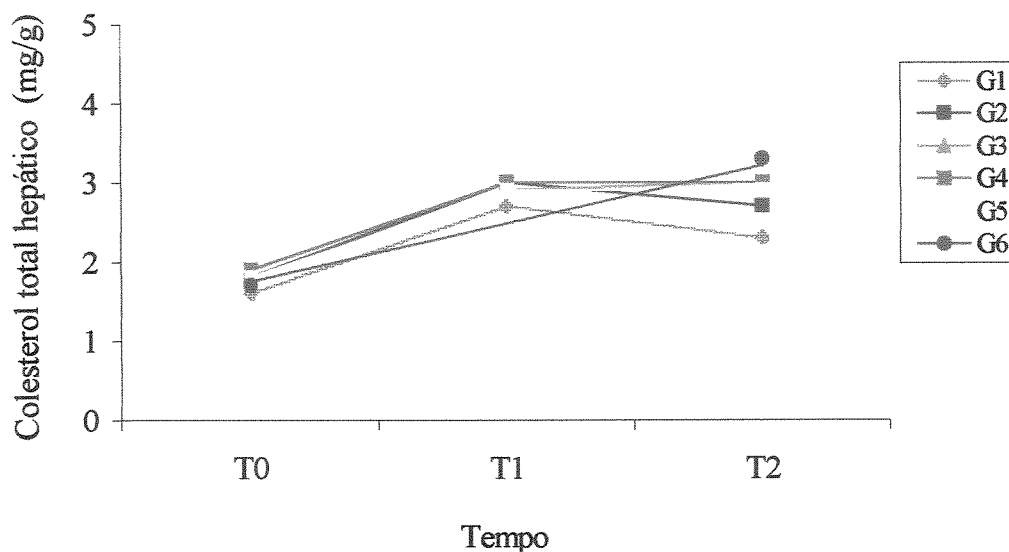


Figura 18. Teores médios de colesterol total hepático (mg/g) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) em: GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 4 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A**, com vitamina E (60 mg/dia); GRUPO 5 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 6 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E, por um período de 30 dias e posteriormente durante 15 dias, suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1.

A Figura 19 demonstra os teores de triacilgliceróis hepáticos (mg/g), onde se observa que, nos Tempos 0 e 1, apresentaram valores menores em relação ao Tempo 2, para todos os grupos experimentais ($p < 0,05$).

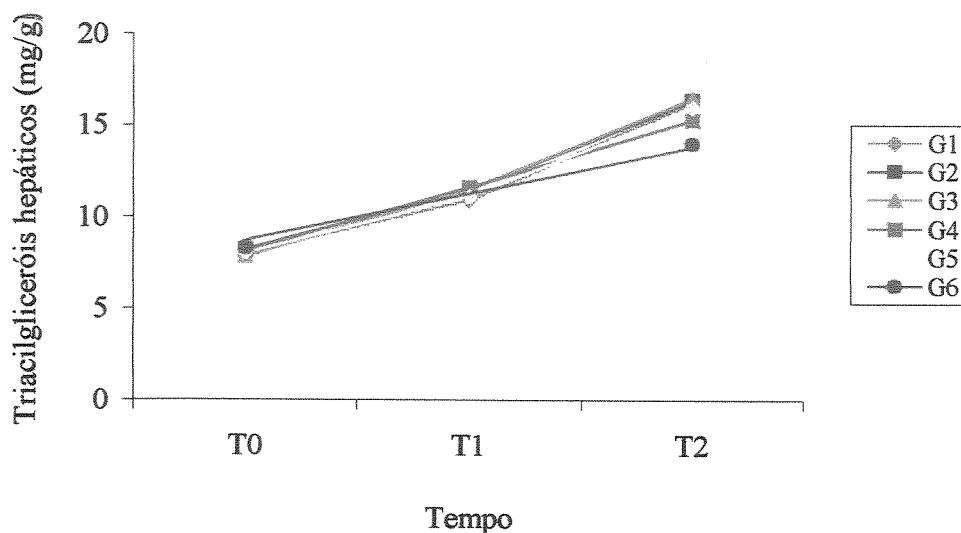


Figura 19. Teores médios de triacilgliceróis hepáticos (mg/g) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) em: GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 4 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A**, com vitamina E (60 mg/dia); GRUPO 5 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 6 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E, por um período de 30 dias e posteriormente durante 15 dias, suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1.

4.2.7 Consumo médio de dieta (g) e peso médio (g) dos animais

Na Figura 20 (A-B), estão apresentadas as médias do consumo médio de dieta por grupo (g) e o peso médio (g) dos ratos durante os 45 dias do *primeiro ensaio biológico* respectivamente.

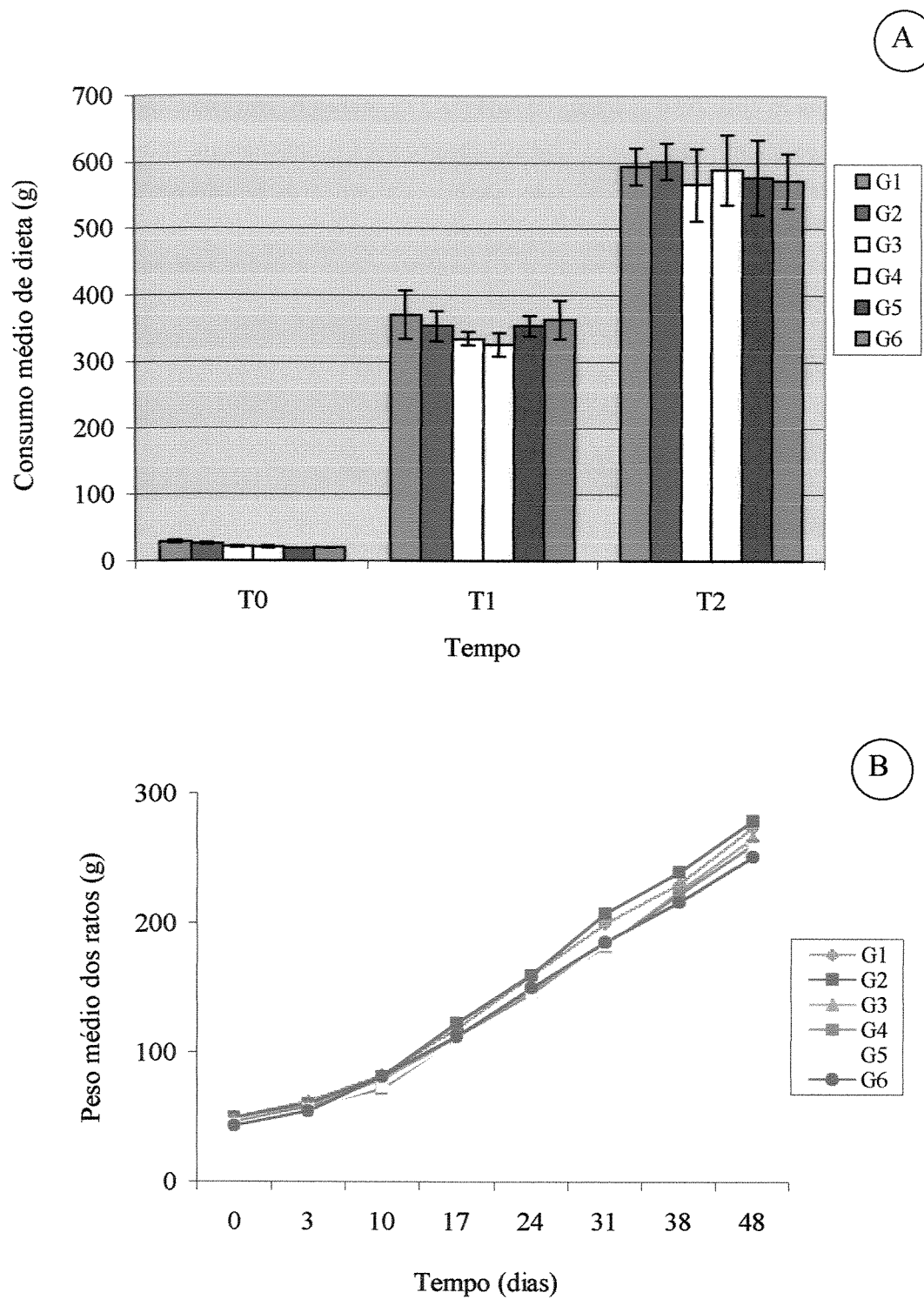


Figura 20 (A-B). Consumo médio de dieta por grupo (g) (A) e Peso médio (g) (B) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (3 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) em: GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da marca A com vitamina E

(120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 4 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A**, com vitamina E (60 mg/dia); GRUPO 5 – 1 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 6 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E, por um período de 30 dias e posteriormente durante 15 dias, suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1.

4.3 Segundo ensaio biológico

4.3.1 Índice de peróxido (IP) sérico e hepático

A Figura 21 (A-B) mostra os valores médios do índice de peróxido (IP) sérico e hepático, onde se observa um aumento no índice de peróxido sérico, nos Grupos 1 e 3, nos Tempos 1 e 2, em relação ao Tempo 0 com diferença significativa ($p < 0,05$); com relação ao índice de peróxido hepático, o Grupo 3 apresentou valores médios mais elevados do que os demais grupos, tanto para o Tempo 1 como para o Tempo 2, com diferença significativa ($p < 0,01$).

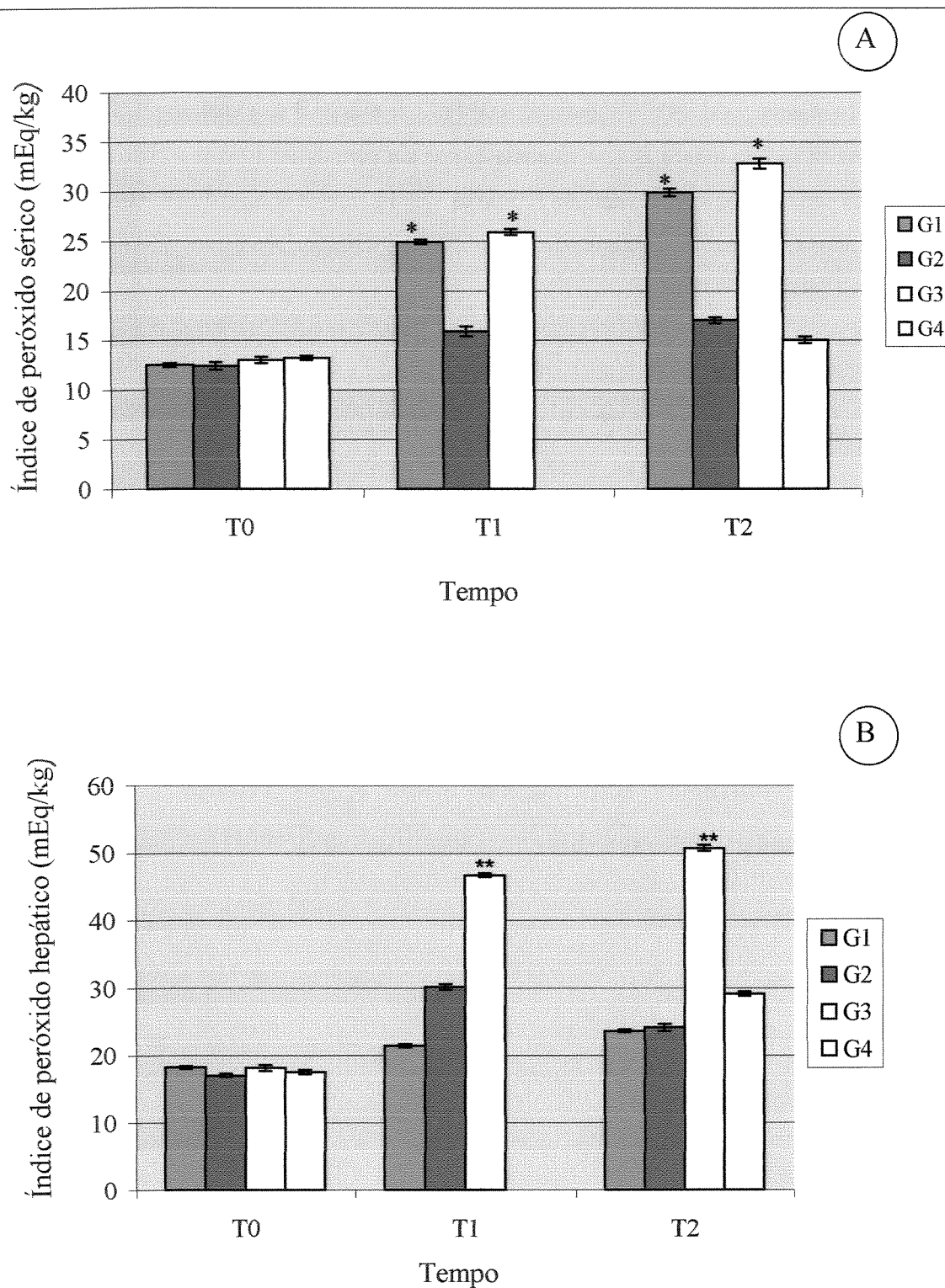


Figura 21 (A-B). Teores médios de índice de peróxido (IP) sérico (A) e hepático (B) (mEq/kg) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) em:

GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B** sem vitamina E; GRUPO 4 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B** sem vitamina E, por um período de 30 dias e posteriormente durante 15 dias suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ em relação ao valor de referência ao longo dos tempos.

4.3.2 Teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) sérico e hepático

Na Figura 22 (A-B), estão demonstrados os teores médios das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) sérico e hepático, em que ocorreu um aumento, nos teores médios séricos, dos Grupos 1 e 3, nos Tempos 1 e 2, com relação ao Tempo 0; com relação aos teores médios hepáticos, observou-se um aumento, no Grupo 3, nos Tempos 1 e 2, com relação aos demais grupos, com diferença significativa ($p < 0,01$).

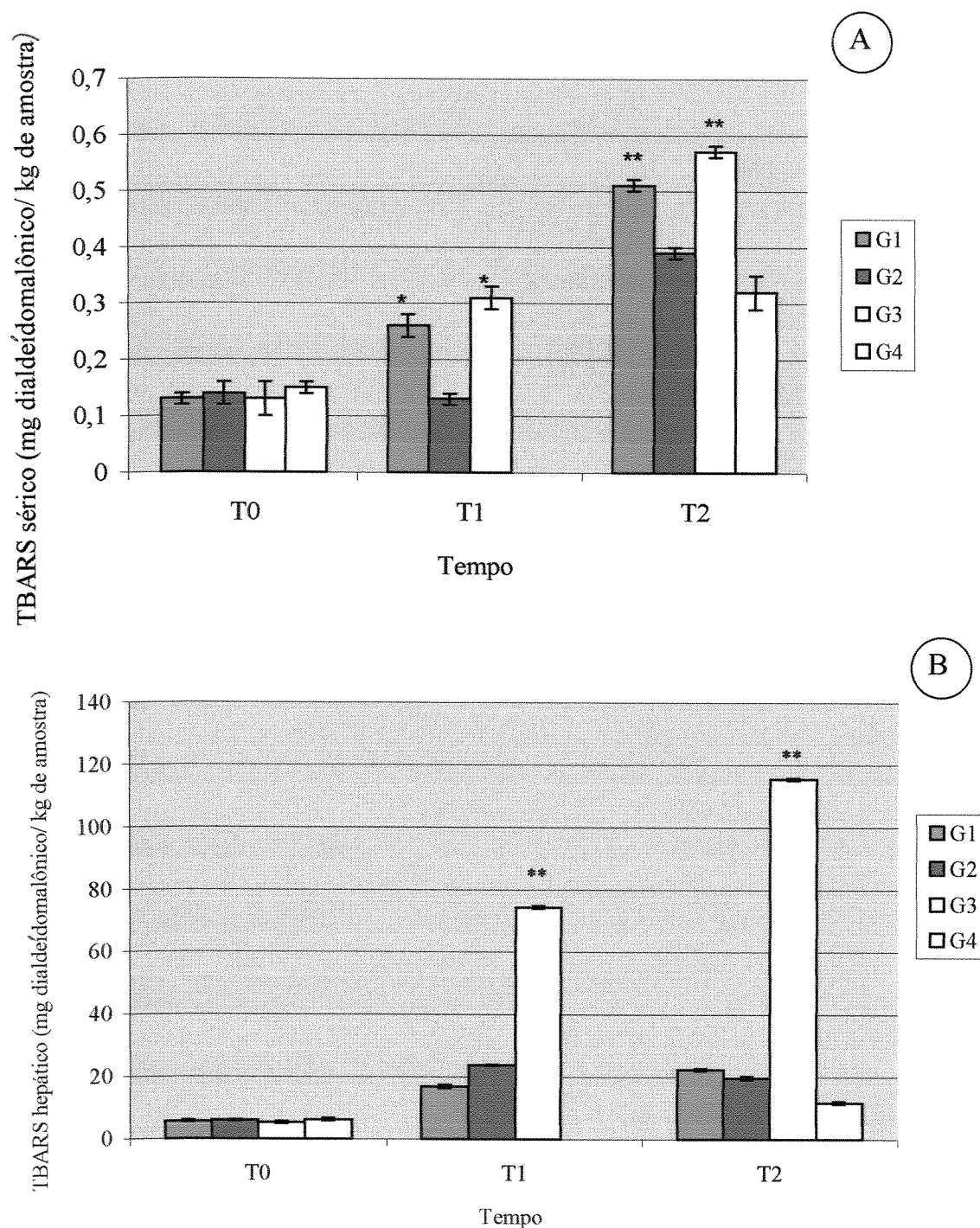


Figura 22 (A-B). Teores médios de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) sérico (A) e hepático (B) (mg dialdeídomalônico/kg de amostra) de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) em: GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de

óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B** sem vitamina E; GRUPO 4 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B** sem vitamina E, por um período de 30 dias e posteriormente durante 15 dias suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1. **p<0,01; *p<0,05, em relação ao valor de referência ao longo dos tempos.

4.3.3 Vitamina E (tocoferóis totais) sérica e hepática

A Tabela 10 expressa os valores de vitamina E (tocoferóis totais) séricos e hepáticos dos animais experimentais.

Tabela 10. Teores médios de vitamina E (tocoferóis totais) séricos e hepáticos de ratos Wistar suplementados por gavagem nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias).

Grupos	Tempos	Vitamina E (tocoferóis totais) sérica (mg de Tocoferol/100g)	Vitamina E (tocoferóis totais) hepática (mg de Tocoferol/100g)
VALOR DE REFERÊNCIA	T0 (11 DIAS)	0,1±0,02 ^a	0,4±0,09 ^a
GRUPO 1 – CONTROLE – Óleo de soja – 2 g/dia	T1 (30 DIAS)	0,2±0,10 ^{ab}	0,7±0,10 ^b
GRUPO 2 – AGPI ω-3 – 2 g/dia marca A c/ vitamina E	T1	0,5±0,08 ^c	1,0±0,20 ^c
GRUPO 3 – AGPI ω-3 – 2 g/dia marca B s/ vitamina E	T1	0,3±0,02 ^{ac}	0,4±0,07 ^a
GRUPO 4 – AGPI ω-3 – 2 g/dia marca B s/ vitamina E + vitamina E (400 mg/dia) marca C	T1	-	-
GRUPO 1 – CONTROLE – Óleo de soja – 2 g/dia	T2 (45 DIAS)	0,4±0,02 ^{bc}	1,1±0,20 ^c
GRUPO 2 – AGPI ω-3 – 2 g/dia marca A c/ vitamina E	T2	1,4±0,20 ^d	2,6±0,10 ^d
GRUPO 3 – AGPI ω-3 – 2 g/dia marca B s/ vitamina E	T2	0,8±0,05 ^e	1,0±0,09 ^c
GRUPO 4 – AGPI ω-3 – 2 g/dia marca B s/ vitamina E + vitamina E (400 mg/dia) marca C	T2	2,4±0,20 ^f	5,9±0,20 ^e

^{a, b, c, d, e, f} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05).

4.3.4 Teores médios dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (%) sérico hepático

Os teores médios séricos (%) de ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados foram os seguintes: palmítico (16:0) $0,6 \pm 0,5$; esteárico (18:0) $0,5 \pm 0,1$; oléico (18:1) $0,4 \pm 0,4$; para os AGPI ω -3: α -linolênico (18:3) $0,5 \pm 0,3$; docosahexaenóico (DHA) (22:6 ω -3) $0,4 \pm 0,1$, para o Tempo 0; para o Tempo 1, encontrou-se, como média dos grupos: palmítico $1,5 \pm 0,1$; esteárico $1,4 \pm 0,3$; oléico $1,6 \pm 0,2$ e para os AGPI ω -3: α -linolênico $1,3 \pm 0,5$; DHA $0,9 \pm 0,6$; e, para o Tempo 2, encontrou-se os seguintes valores médios entre os grupos: palmítico $1,5 \pm 0,3$; esteárico $1,6 \pm 0,2$; oléico $1,5 \pm 0,2$ e AGPI ω -3: α -linolênico $1,6 \pm 0,2$; DHA $1,4 \pm 0,1$, com diferença significativa ($p < 0,05$) (Tabela 11).

A Tabela 12 mostra que os teores hepáticos encontrados, no Tempo 0, foram os seguintes: palmítico $0,8 \pm 0,3$; esteárico $0,7 \pm 0,6$; oléico $0,6 \pm 0,2$; para os AGPI ω -6: α -linoléico (18:2) $0,5 \pm 0,1$; para os AGPI ω -3: α -linolênico $0,2 \pm 0,1$; docosapentaenóico (22:5) $0,5 \pm 0,3$; DHA $0,3 \pm 0,2$; para o Tempo 1, encontraram-se os seguintes resultados: palmítico $2,5 \pm 0,6$; esteárico $2,1 \pm 0,6$; oléico $1,8 \pm 0,1$; AGPI ω -6: α -linoléico $1,6 \pm 0,4$; e para os AGPI ω -3: α -linolênico $1,1 \pm 0,5$; docosapentaenóico $1,4 \pm 1,0$; DHA $1,0 \pm 0,7$; para o Tempo 2, os valores médios foram: palmítico $3,4 \pm 0,1$; esteárico $2,5 \pm 0,2$; oléico $3,3 \pm 0,4$; α -linoléico $1,8 \pm 0,4$; para os AGPI ω -3: α -linolênico $1,1 \pm 0,3$; docosapentaenóico $1,2 \pm 0,7$; DHA $1,0 \pm 0,4$, com diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 11. Teores médios de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (AGPI) encontrados no soro (%) de ratos Wistar, nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) de suplementação com AGPI ω -3, com e sem vitamina E.

Ácidos graxos	Tempo 0 (11 DIAS)	Tempo 1 (30 DIAS)			Tempo 2 (45 DIAS)			
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
16:0	0,6 $\pm$ 0,3 ^a	1,6 $\pm$ 0,1 ^b	1,4 $\pm$ 0,2 ^c	1,4 $\pm$ 0,1 ^c	1,5 $\pm$ 0,7 ^{bc}	1,2 $\pm$ 0,3 ^d	1,6 $\pm$ 0,6 ^b	1,8 $\pm$ 0,6 ^e
18:0	0,5 $\pm$ 0,1 ^a	1,1 $\pm$ 0,3 ^b	1,7 $\pm$ 0,4 ^{cf}	1,3 $\pm$ 0,3 ^d	1,8 $\pm$ 0,5 ^c	1,5 $\pm$ 0,4 ^e	1,3 $\pm$ 0,2 ^d	1,6 $\pm$ 0,5 ^{ef}
18:1	0,4 $\pm$ 0,1 ^a	1,5 $\pm$ 0,3 ^b	1,4 $\pm$ 0,1 ^b	1,8 $\pm$ 0,4 ^c	1,3 $\pm$ 0,2 ^b	1,7 $\pm$ 0,6 ^d	1,7 $\pm$ 0,4 ^d	1,4 $\pm$ 0,4 ^b
18:2n-6	0,5 $\pm$ 0,1 ^a	0,6 $\pm$ 0,2 ^{ab}	0,5 $\pm$ 0,2 ^a	0,9 $\pm$ 0,1 ^c	0,7 $\pm$ 0,1 ^{bd}	0,9 $\pm$ 0,2 ^c	0,8 $\pm$ 0,2 ^{cde}	0,7 $\pm$ 0,1 ^{be}
20:3n-6	0,4 $\pm$ 0,2 ^{ac}	0,5 $\pm$ 0,1 ^{ab}	0,3 $\pm$ 0,1 ^{cd}	0,2 $\pm$ 0,1 ^d	0,7 $\pm$ 0,2 ^e	0,4 $\pm$ 0,1 ^{ac}	0,6 $\pm$ 0,3 ^{be}	0,6 $\pm$ 0,2 ^{be}
20:4n-6	0,2 $\pm$ 0,1 ^a	0,9 $\pm$ 0,3 ^{bc}	1,0 $\pm$ 0,1 ^c	0,8 $\pm$ 0,3 ^{bde}	0,9 $\pm$ 0,3 ^{ce}	0,7 $\pm$ 0,1 ^d	0,9 $\pm$ 0,1 ^{cd}	0,7 $\pm$ 0,3 ^d
22:4n-6	0,7 $\pm$ 0,4 ^a	0,8 $\pm$ 0,4 ^{ab}	0,9 $\pm$ 0,3 ^b	0,7 $\pm$ 0,1 ^{ac}	0,4 $\pm$ 0,1 ^d	0,8 $\pm$ 0,2 ^{ab}	0,6 $\pm$ 0,2 ^c	0,4 $\pm$ 0,1 ^d
18:3n-3	0,5 $\pm$ 0,3 ^a	0,8 $\pm$ 0,2 ^b	1,8 $\pm$ 0,4 ^c	1,4 $\pm$ 0,6 ^d	1,8 $\pm$ 0,4 ^c	1,7 $\pm$ 0,4 ^{ce}	1,3 $\pm$ 0,5 ^d	1,6 $\pm$ 0,4 ^e
20:5n-3	0,6 $\pm$ 0,2 ^{ac}	0,4 $\pm$ 0,1 ^{bc}	0,4 $\pm$ 0,1 ^{bc}	0,3 $\pm$ 0,1 ^b	0,7 $\pm$ 0,2 ^a	0,5 $\pm$ 0,1 ^{cd}	0,6 $\pm$ 0,3 ^{ad}	0,7 $\pm$ 0,3 ^a
22:5n-3	0,3 $\pm$ 0,1 ^a	0,6 $\pm$ 0,2 ^b	0,6 $\pm$ 0,2 ^b	0,8 $\pm$ 0,4 ^c	0,9 $\pm$ 0,3 ^c	0,7 $\pm$ 0,2 ^{bc}	0,4 $\pm$ 0,1 ^a	0,6 $\pm$ 0,2 ^b
22:6n-3	0,4 $\pm$ 0,1 ^a	0,2 $\pm$ 0,1 ^b	1,1 $\pm$ 0,1 ^c	1,3 $\pm$ 0,2 ^{de}	1,2 $\pm$ 0,1 ^{cd}	1,4 $\pm$ 0,1 ^{ef}	1,5 $\pm$ 0,3 ^f	1,4 $\pm$ 0,1 ^{ef}

GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 4 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E, por um período de 30 dias e posteriormente durante 15 dias, suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1.

^{a, b, c, d, e, f} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 12. Teores médios de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (AGPI) encontrados no fígado (%) de ratos Wistar, nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) de suplementação com AGPI ω -3, com e sem vitamina E.

Ácidos graxos	Tempo 0 (11 DIAS)	Tempo 1 (30 DIAS)			Tempo 2 (45 DIAS)			
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
16:0	0,8±0,3 ^a	2,0±0,5 ^b	2,3±0,1 ^c	3,1±0,7 ^d	3,4±0,1 ^c	3,5±0,4 ^c	3,3±0,1 ^c	3,2±0,1 ^d
18:0	0,7±0,6 ^a	2,7±0,2 ^b	1,9±0,6 ^c	1,7±0,3 ^d	2,8±0,2 ^b	2,3±0,7 ^e	2,3±0,6 ^e	2,4±0,2 ^e
18:1	0,6±0,2 ^a	1,1±0,4 ^b	1,3±0,8 ^c	3,0±0,6 ^c	3,2±0,6 ^d	2,9±0,9 ^c	3,8±0,7 ^e	3,1±0,4 ^{cd}
18:2n-6	0,5±0,1 ^a	0,7±0,3 ^b	0,4±0,1 ^{ao}	0,3±0,1 ^c	0,6±0,3 ^{ab}	0,7±0,1 ^b	0,8±0,2 ^b	0,6±0,1 ^{ab}
20:3n-6	0,1±0,7 ^a	0,6±0,3 ^b	0,7±0,3 ^{bo}	0,8±0,2 ^c	0,6±0,1 ^b	0,5±0,1 ^d	0,4±0,2 ^d	0,7±0,3 ^{bo}
20:4n-6	0,4±0,8 ^{ab}	0,3±0,4 ^b	0,7±0,2 ^c	0,5±0,1 ^{ad}	0,5±0,2 ^{ad}	0,6±0,1 ^{cd}	0,7±0,4 ^{cd}	0,9±0,1 ^e
22:4n-6	0,5±0,5 ^{ad}	0,9±0,3 ^b	0,5±0,6 ^{ad}	0,5±0,9 ^{ad}	0,8±0,3 ^b	1,1±0,7 ^c	0,6±0,1 ^a	0,4±0,1 ^d
18:3n-3	0,2±0,1 ^a	0,6±0,7 ^b	1,5±0,6 ^c	1,1±0,1 ^d	0,7±0,1 ^b	1,3±0,4 ^e	1,1±0,7 ^d	1,4±0,5 ^{ce}
20:5n-3	0,4±0,4 ^a	0,6±0,6 ^{bo}	0,7±0,3 ^b	0,5±0,8 ^{ao}	0,4±0,1 ^a	0,6±0,1 ^{bo}	0,6±0,3 ^{bo}	0,5±0,1 ^{ac}
22:5n-3	0,5±0,3 ^a	0,5±0,7 ^a	1,4±0,1 ^b	2,4±0,7 ^c	0,5±0,7 ^a	1,1±0,4 ^d	1,0±0,5 ^d	2,1±0,6 ^e
22:6n-3	0,3±0,2 ^{ab}	0,2±0,4 ^b	1,2±0,4 ^c	1,6±0,2 ^d	0,4±0,4 ^a	1,2±0,1 ^c	1,2±0,1 ^c	1,2±0,1 ^c

GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E; GRUPO 4 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B**, sem vitamina E, por um período de 30 dias e posteriormente durante 15 dias, suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1.

^{a, b, c, d, e} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

4.3.5 Lípides totais séricos e hepáticos

A Tabela 13 mostra o percentual de lípides totais séricos e hepáticos dos ratos suplementados com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, com e sem vitamina E.

Tabela 13. Teores médios de lípides totais séricos e hepáticos de ratos Wistar suplementados, por gavagem, nos Tempos 0 (11 dias), 2 (30 dias) e 2 (45 dias).

Grupos	Tempos	Lípides totais séricos (%)	Lípides totais hepáticos (%)
VALOR DE REFERÊNCIA	T0 (11 DIAS)	0,7±0,06 ^{ab}	5,6±0,3 ^a
GRUPO 1 – CONTROLE – Óleo de soja – 2 g/dia	T1 (30 DIAS)	0,6±0,03 ^{bc}	7,3±0,7 ^{bd}
GRUPO 2 – AGPI ω-3 – 2 g/dia marca A c/ vitamina E	T1	0,6±0,06 ^{bc}	6,6±0,9 ^{bc}
GRUPO 3 – AGPI ω-3 – 2 g/dia marca B s/ vitamina E	T1	0,5±0,06 ^c	6,3±0,2 ^{ac}
GRUPO 4 – AGPI ω-3 – 2 g/dia marca B s/ vitamina E + vitamina E (400 mg/dia) marca C	T1	-	-
GRUPO 1 – CONTROLE – Óleo de soja – 2 g/dia	T2 (45 DIAS)	0,8±0,05 ^a	7,5±0,8 ^{bc}
GRUPO 2 – AGPI ω-3 – 2 g/dia marca A c/ vitamina E	T2	0,6±0,06 ^{bc}	6,3±0,6 ^{ac}
GRUPO 3 – AGPI ω-3 – 2 g/dia marca B s/ vitamina E	T2	0,4±0,02 ^{cd}	6,9±0,7 ^{bcd}
GRUPO 4 – AGPI ω-3 – 2 g/dia marca B s/ vitamina E + vitamina E (400 mg/dia) marca C	T2	0,3±0,01 ^d	7,3±0,7 ^{bd}

^{a, b, c, d} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05).

4.3.6 Perfil lipídico sérico

Os teores de colesterol total sérico (mg/dl) são apresentados na Figura 23, que mostra um aumento significativo ($p<0,05$), no Tempo 2, com relação ao Tempo 0.

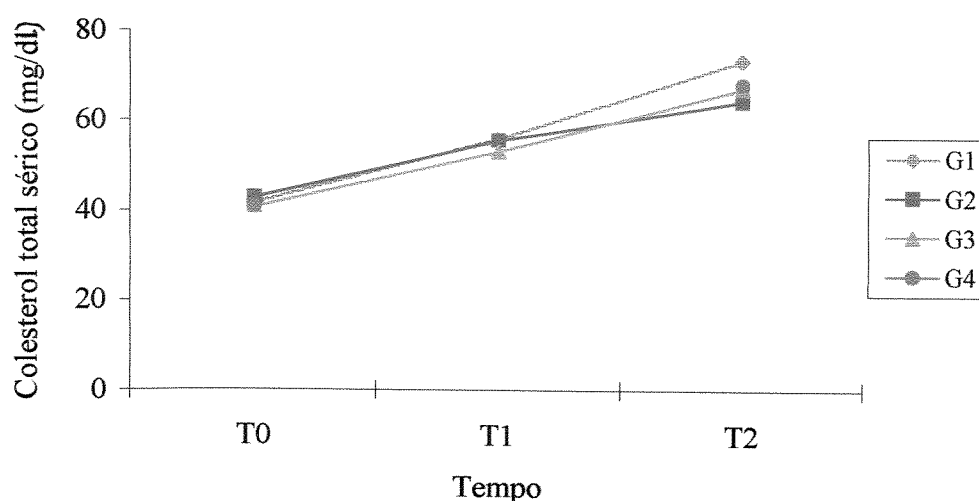


Figura 23. Teores médios de colesterol total sérico (mg/dl) de ratos Wistar suplementados por gavagem, nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) em: GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B** sem vitamina E; GRUPO 4 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B** sem vitamina E, por um período de 30 dias e posteriormente durante 15 dias suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1.

No que se refere aos teores de HDL-colesterol sérico (mg/dl) (Figura 24), observou-se uma redução dos teores ($p<0,05$), em todos os grupos experimentais do Tempo 0 e do Tempo 1, para o Tempo 2.

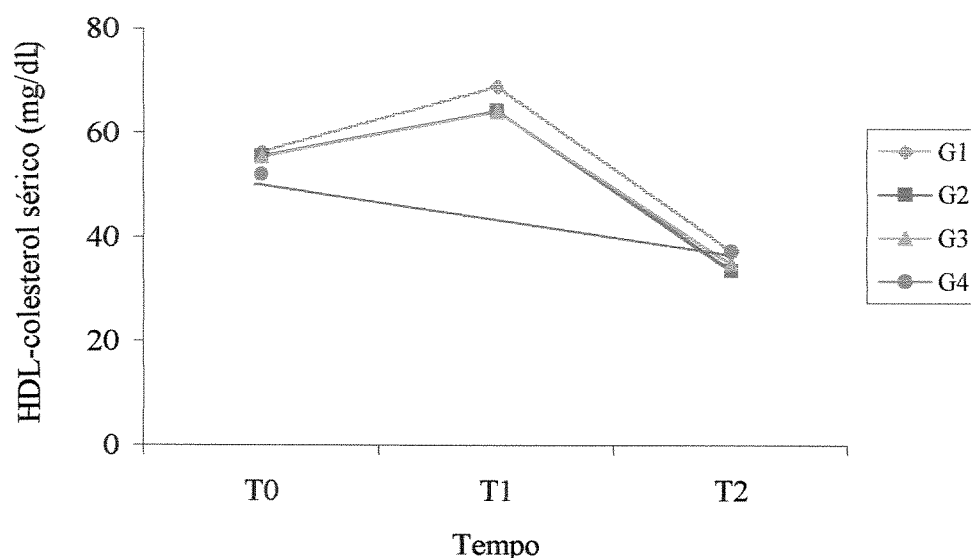


Figura 24. Teores médios de HDL-colesterol sérico (mg/dl) de ratos Wistar, suplementados por gavagem, nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) em: GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B** sem vitamina E; GRUPO 4 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B** sem vitamina E, por um período de 30 dias e, posteriormente, durante 15 dias, suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1.

Com relação aos teores de LDL-colesterol sérico (mg/dl) (Figura 25), observou-se também uma redução dos teores ($p < 0,05$) para todos os grupos experimentais do Tempo 0, e do Tempo 1 para o Tempo 2.

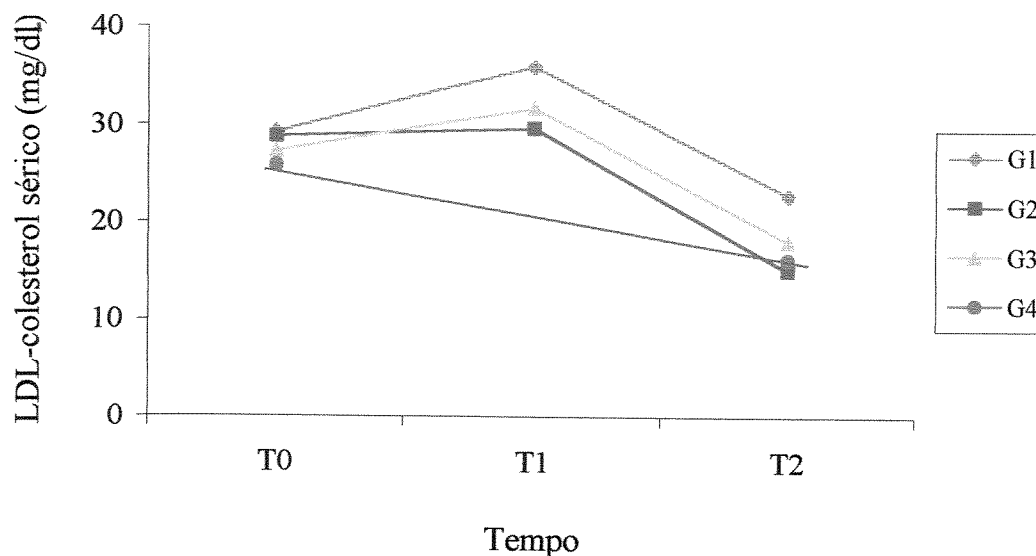


Figura 25. Teores médios de LDL-colesterol sérico (mg/dl) de ratos Wistar, suplementados por gavagem, nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) em: GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B** sem vitamina E; GRUPO 4 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B** sem vitamina E, por um período de 30 dias e, posteriormente, durante 15 dias, suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1.

Com relação aos teores encontrados para o VLDL-colesterol sérico (mg/dl) (Figura 26), os mesmos apresentaram um aumento ($p < 0,05$) Tempo 0 para o Tempo 1, retornando aos valores iniciais no Tempo 2.

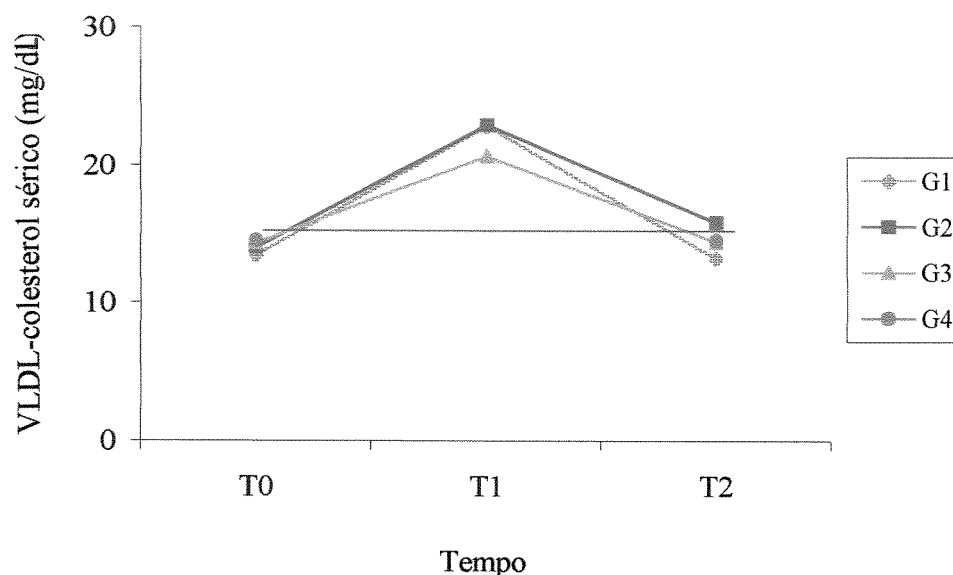


Figura 26. Teores médios de VLDL-colesterol sérico (mg/dL) de ratos Wistar, suplementados por gavagem, nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) em: GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B** sem vitamina E; GRUPO 4 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B** sem vitamina E, por um período de 30 dias e, posteriormente, durante 15 dias, suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1.

No que diz respeito aos valores encontrados para os triacilgliceróis séricos (mg/dL) (Figura 27), observou-se também um aumento do Tempo 0 para o Tempo 1, com posterior diminuição dos valores para o Tempo 2, voltando aos valores iniciais, com diferença significativa ($p < 0,05$).

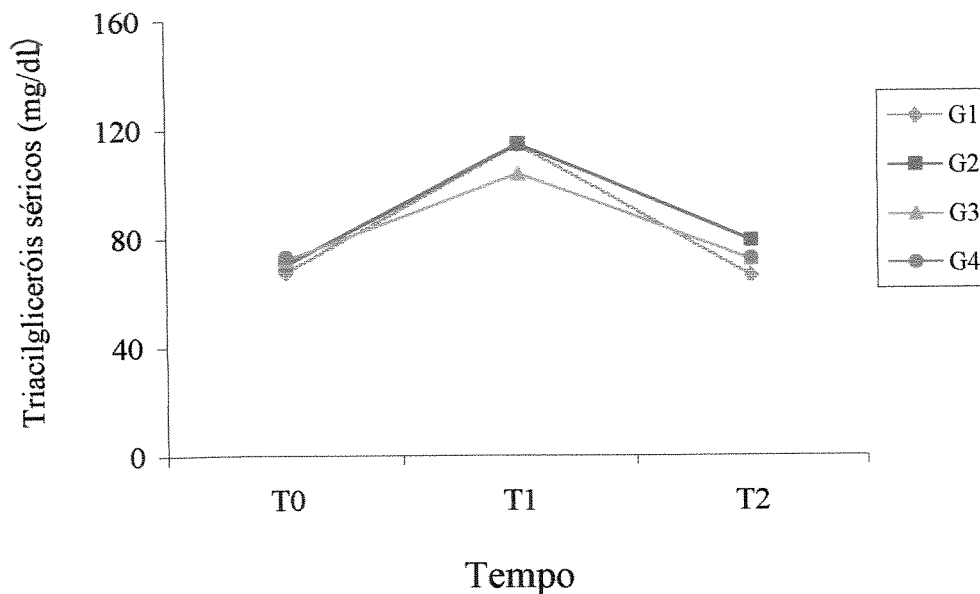


Figura 27. Teores médios de triacilgliceróis séricos (mg/dl) de ratos Wistar, suplementados por gavagem, nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) em: GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B** sem vitamina E; GRUPO 4 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B** sem vitamina E, por um período de 30 dias e, posteriormente, durante 15 dias, suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1.

4.3.7 Perfil lipídico hepático

Na Figura 28, estão apresentados os resultados dos teores de colesterol total hepático (mg/g), onde se observa ter havido um aumento do Tempo 0 para o Tempo 1, e para Tempo 2, com significância ($p < 0,05$) apenas para os Grupos 1 e Grupo 3.

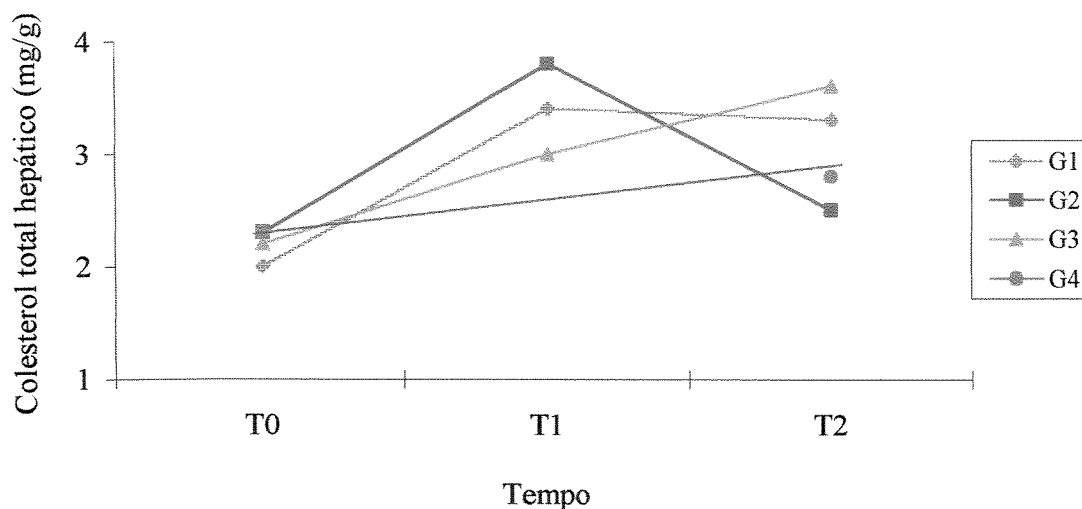


Figura 28. Teores médios de colesterol total hepático (mg/g) de ratos Wistar, suplementados por gavagem, nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) em: GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B** sem vitamina E; GRUPO 4 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B** sem vitamina E, por um período de 30 dias e, posteriormente, durante 15 dias suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1.

Segundo os dados apresentados na Figura 29, os teores de triacilgliceróis hepáticos (mg/g) apresentaram valores maiores, no Tempo 2, em comparação aos Tempos 0, e Tempo 1 de suplementação com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, com e sem vitamina E, à exceção do Grupo 2.

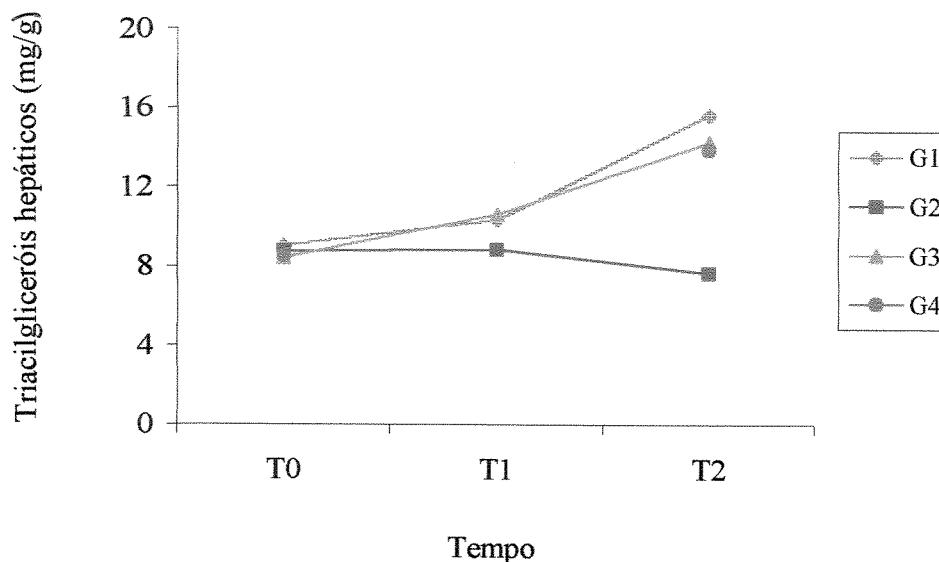


Figura 29. Teores médios de triacilgliceróis hepáticos (mg/g) de ratos Wistar, suplementados por gavagem, nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) em: GRUPO 1 - Controle – 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B** sem vitamina E; GRUPO 4 – 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B** sem vitamina E, por um período de 30 dias e, posteriormente, durante 15 dias suplementação com vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1.

4.3.8 Consumo médio de dieta (g) e peso médio (g) dos animais

A Figura 30 (A-B) mostra as médias do consumo médio de dieta (g) em cada grupo experimental, nos Tempos 0, 1 e 2, e o peso médio (g) dos animais, durante os 45 dias do *segundo ensaio biológico*. Pode ser observada, na Figura 32 A e 32 B, a não ocorrência de diferença estatística ($p > 0,05$) entre as médias de consumo de dieta dos grupos, nos 3 Tempos, e a média de peso dos ratos ao longo dos 45 dias de experimento, respectivamente.

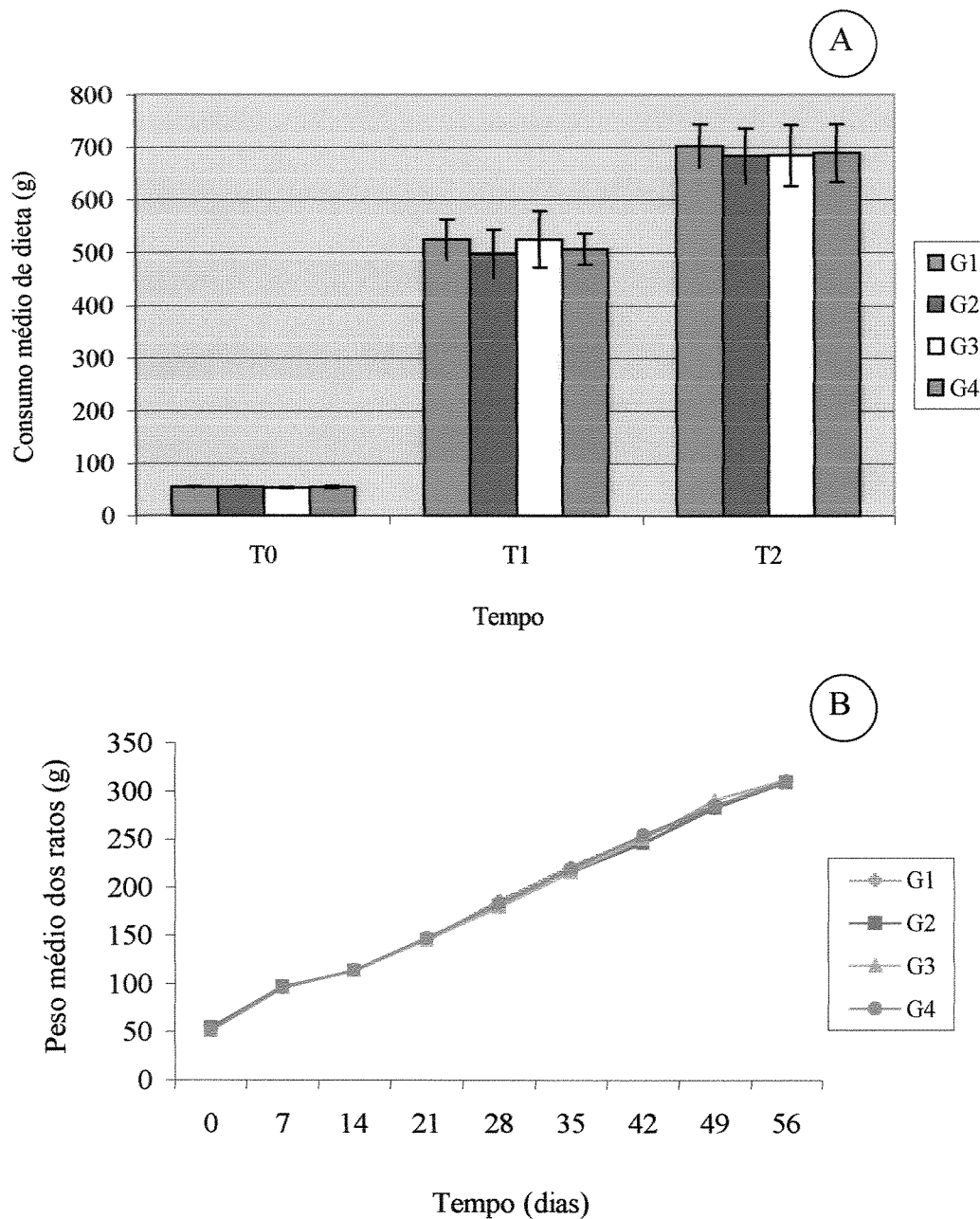


Figura 30 (A-B). Consumo médio de dieta (g) (A) e Peso médio (g) (B) de ratos Wistar, suplementados por gavagem, nos Tempos 0 (11 dias), 1 (30 dias) e 2 (45 dias) em: GRUPO 1 - Controle - 2 g/dia de óleo de soja; GRUPO 2 - 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca A** com vitamina E (120 mg/dia); GRUPO 3 - 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B** sem vitamina E; GRUPO 4 - 2 g/dia de AGPI ω -3 da **marca B** sem vitamina E, por um período de 30 dias e, posteriormente, durante 15 dias suplementação com vitamina E (**marca C** - 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol). Nesse grupo, não houve sacrifício de animais no Tempo 1.

5 DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da oxidação lipídica através do Índice de peróxido (IP) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) séricos e hepáticos

Os teores dos grupos experimentais, que não receberam vitamina E, apresentaram valores maiores ($p < 0,05$) de IP, com relação aos grupos experimentais que receberam vitamina E (Figuras 11 A, 21 A-B). No que se refere aos teores de TBARS sérico e hepático (Figuras 11 B, 22 A-B), também os resultados mostraram que, nos grupos experimentais suplementados com AGPI ω -3, com vitamina E, apresentaram valores mais baixos do que os grupos que não receberam vitamina E ($p < 0,05$). Observou-se, neste estudo, que a vitamina E fez o papel de proteção sobre a oxidação lipídica, ao nível sérico e hepático, nos animais suplementados com AGPI ω -3 nos Tempos 1 e 2.

Os AGPI ω -3 são mais susceptíveis à oxidação devido aos números de duplas ligações em sua estrutura química, por isso os resultados, encontrados por Saito & Nakatsugawa (1994), sugerem que a ingestão de AGPI ω -3 seja associada a antioxidante (α -tocoferol) para prevenir a oxidação em nível celular, pois a oxidação lipídica acelera o processo de aterosclerose, causando prejuízo à saúde humana. Song & Miyazawa (2001) mostraram um aumento nos níveis de TBARS, no plasma e fígado, dos animais suplementados com AGPI ω -3 sem vitamina E; os autores concluíram que a vitamina E protegeu na oxidação lipídica.

Vários estudos (Leibowitz et al., 1990; Miyazawa, 1999; Mouri, 1984; Meydani et al., 1991) mostram a proteção da vitamina E, na oxidação lipídica,

em ratos suplementados com AGPI ω -3. Suarez et al. (1999) relataram que a associação da vitamina E à suplementação com AGPI ω -3 protegeu os eritrócitos e fígados da peroxidação lipídica durante o desenvolvimento e crescimento neonatal dos ratos. No estudo realizado por Shimizu et al. (2001), o efeito do AGPI ω -3 e vitamina E, na peroxidação lipídica, sugerem que os AGPI ω -3 elevados no sangue, a inibição na produção de leucócitos e a vitamina E inibem a peroxidação lipídica em experimento com ratos com colitis. A influência da vitamina E, nos teores de AGPI ω -3 e malonaldeído (MDA), em alguns tecidos de ratos diabéticos, mostraram que a suplementação com vitamina E, em estudo experimental com ratos, proporcionou um controle na oxidação e alteração de AGPI, no metabolismo dos tecidos, afetando as complicações em ratos diabéticos (Celik et al., 2002).

Faz-se necessária toda a atenção à oxidação lipídica dos AGPI ω -3, em nível celular, devido à formação de diversos lipídios oxidados e outras substâncias potencialmente tóxicas. Nesse sentido, a ingestão de AGPI ω -3, sem a proteção de antioxidante, ocorre formação de hidroperóxidos e aldeídos, provocando degeneração hepática e renal, alterações nos sistemas enzimáticos do metabolismo de xenobióticos e distúrbios nos níveis séricos de diversas enzimas (Kubow, 1992; Esterbauer, 1993).

Os prejuízos causados pela ação dos radicais livres são extensos e danosos. Nas membranas celulares, ocorrem modificações estruturais e perturbações da fluidez, decorrentes da peroxidação lipídica de AGPI presentes na membrana, interferindo na atividade de enzimas e em seus receptores. Também ocorrem alterações químicas das bases de DNA e

modificação das estruturas das proteínas, o que pode significar dano gênico no primeiro caso e degeneração proteolítica, no segundo (Diniz, 2000).

É importante salientar a necessidade de proteger esses compostos da oxidação a que são particularmente sensíveis, e que geraria efeitos nocivos. O uso de vitamina E foi estudado por Drevon (1992), com o propósito de evitar a oxidação dos AGPI ω -3; ele recomenda aumento nas taxas diárias de vitamina E, no caso do aumento do consumo de AGPI. Em um estudo feito por Leibowitz et al. (1990), observou-se que a vitamina E teve um efeito protetor no fígado e no coração de ratos, submetidos a uma dieta que continha óleo de peixe ou uma mistura de óleo de milho e gordura animal (1:1).

O índice de peróxido mede os produtos primários da oxidação lipídica, e sua determinação está baseada no fato de todas as substâncias oxidantes presentes, na amostra, serem peróxidos. A peroxidação lipídica pode ser inibida por antioxidantes naturais que interrompem a cadeia de peroxidação reagindo com os radicais peroxila ou alcóxila. Entre esses antioxidantes está o α -tocoferol, que fornece átomo de hidrogênio para o radical peroxila dos ácidos graxos, impedindo, dessa forma, a reação, em cadeia, que se propaga nas membranas celulares (Tidus et al., 1993; Halliwell, 1991).

Estudos realizados por Draper et al. (1984) e Kubow (1992) revelaram que a deficiência de vitamina E e selênio, e a ingestão de lipoperóxidos e malonaldeído, constituem determinantes da anemia hemolítica oriunda de processos oxidativos.

5.2 Teores médios de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (AGPI) sérico e hepático

Os resultados dos teores médios de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (AGPI) sérico e hepático, para o *primeiro* (Tabela 8) e, *segundo ensaios biológicos* (Tabelas 11 e 12 respectivamente), mostram que houve diferença significativa ($p < 0,05$) dos grupos experimentais, nos Tempos 1 e 2, com relação ao Tempo 0. Observou-se que, ao longo da suplementação com AGPI ω -3, houve um aumento dos ácidos graxos saturados: palmítico, esteárico, monoinsaturados: oléico, e os AGPI ω -3 α -linolênico e o docosahexaenóico (DHA), enquanto que o eicosapentaenóico (EPA) não aumentou, tanto sangüíneo quanto hepático, em todos os grupos experimentais. Observou-se uma relação dose-resposta entre os teores de AGPI ω -3, ao longo da suplementação, com relação ao perfil lipídico sangüíneo e hepático dos ratos. Enquanto que, no fígado, houve um aumento do ácido docosapentaenóico.

Vognild et al. (1998) estudaram a composição de ácidos graxos, no soro de animais que receberam óleo de peixe na dieta, e observaram que, após 12 semanas, houve um aumento significativos ($p < 0,05$) nos teores de EPA e DHA, e uma redução nos teores de α -linolênico, comparando com o grupo controle. Também observaram mudança, mas não significativa, nos teores do ácido oléico no soro.

Song & Miyazawa (2001) demonstraram que o aumento dos teores de DHA afeta, na composição dos AGPI, no plasma e fígado. Harris (1983)

observou que o consumo de óleos de peixes, ricos em AGPI ω -3, leva a um aumento dos níveis de EPA e DHA nos lípides plasmáticos.

5.3 Efeito protetor da vitamina E (tocoferóis totais) sérico e hepático

Os níveis de vitamina E (tocoferóis totais) sérico e hepático, no *segundo ensaio biológico* (Tabela 10), mostraram diferença significativa ($p < 0,05$) do Tempo 0 para os Tempos 1 e 2.

No que se refere aos teores de vitamina E (tocoferóis totais) hepático, observou-se que, tanto no *primeiro*, como no *segundo ensaio biológico*, os valores para o grupo experimental, que recebeu durante 15 dias o suplemento de vitamina E (**marca C** – 400 mg de acetato de DL- α -tocoferol), foram maiores do que os demais grupos experimentais (Tabelas 7 e 10, respectivamente).

A escolha da dosagem de 400 mg de vitamina E, usada nesta pesquisa, foi baseada em estudos de investigação do efeito protetor da vitamina E, quando associada à suplementação com AGPI α -3 (Brown & Wahle, 1990; Harats et al., 1990; Meagher et al., 2001; Granit et al., 2001).

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo abrange a

eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcóxila e peróxila, através da doação de átomos de hidrogênio a essas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (Namiki, 1990; Simic & Javanovic, 1994).

Em um estudo feito para avaliar o efeito dos AGPI ω -3 na recuperação nutricional, observou-se que a administração diária desse suplemento não causou mudanças, nos níveis de peroxidação lipídica, no grupo experimental, o que poderia ser explicado pela ação protetora exercida tanto pelos antioxidantes naturais do organismo como pelo aporte de vitamina E na dieta (Inés et al., 1999). Sodergren et al. (2001), observaram que a vitamina E reduz a peroxidação lipídica, em nível celular, em experimento com ratos, uma vez que a peroxidação lipídica é envolvida em diversos processos de doenças e também no envelhecimento precoce.

O consumo de elevadas quantidades de óleos de peixe aumenta o requerimento de antioxidantes, devido a maior probabilidade de formação de peróxidos e seus efeitos deletérios. Nos óleos de peixe, esse problema pode ser resolvido com a adição de antioxidante como a vitamina E. Niki (1987) sugere uma adição de quantidades significativas de vitamina E (α -tocoferol), que é um potente antioxidante lipossolúvel, em cápsulas de óleo de peixe comercializados, servindo, tanto para prevenir a peroxidação do próprio óleo na cápsula, quanto após sua incorporação às membranas celulares posteriormente a sua ingestão.

A vitamina E mostrou-se eficaz na redução dos teores de TBARS no sangue e no fígado dos ratos suplementados com AGPI ω -3. Nosso resultado

mostra concordância com outros trabalhos (Cho & Choi, 1994; O'Farrell & Jackson, 1997). Ando et al. (1998) pesquisaram o efeito protetor da vitamina E, na redução da oxidação lipídica, nos grupos que receberam AGPI ω -3 com vitamina E, conclui-se que a vitamina E foi consumida para evitar a peroxidação lipídica. Recomenda-se a associação da vitamina E com a suplementação de AGPI ω -3 para proteger do efeito oxidativo, indesejável ao nível celular, nos ratos.

Observa-se que o consumo de vitamina E vem aumentando progressivamente, em particular pelas populações com mais de 40 anos. Dessa maneira, a utilização da vitamina E, dentro de doses limitadas até o total de 800 UI/dia, tem sido observada em número significativo de prescrições (Magnoni & Cukier, 2000).

5.4 Teor de lípidos totais sérico e hepático

Com relação aos lípidos totais hepáticos, no *primeiro ensaio biológico*, todos os grupos experimentais, nos Tempos 1 e 2, apresentaram valores maiores em relação ao Tempo 0, tendo como destaque os Grupos 1 e 3, no Tempo 2, onde apresentaram valores mais elevados que os demais grupos ($p < 0,05$) (Tabela 9).

Os resultados, apresentados na Tabela 13, mostram os níveis de lípidos totais séricos e hepáticos, no *segundo ensaio biológico*, onde se observa que, no sangue, apenas o Grupo 1, no Tempo 2, apresentou valor maior em relação

ao Tempo 0 ($p < 0,05$). Em nível hepático, os grupos experimentais apresentaram valores maiores do que o valor de referência, à exceção dos Grupos 3, no Tempo 1, e do Grupo 2, no Tempo 2.

Dagnelie et al. (1994) estudaram o efeito do óleo de peixe nos níveis de lípidos sangüíneos e observando que a suplementação não interferiu no perfil lipídico sangüíneo.

O jejum de 16 horas foi usado, nesta pesquisa, baseado em referências anteriores, sendo necessário para uma melhor avaliação sangüínea (Nicolosi et al., 1998; Saito et al., 1996).

5.5 Perfil lipídico sérico e hepático

O comportamento do perfil lipídico sérico, para o *primeiro ensaio biológico*, mostra que os teores de lípidos totais séricos (mg/dl), apresentados na Figura 12, permaneceram constantes ao longo dos tempos de suplementação para todos os grupos experimentais, não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$). Considerando o Grupo 1 como referência para os níveis de colesterol total sérico (mg/dl), observou-se um aumento do Tempo 0 para o Tempo 1 de suplementação, mas, com a continuidade da suplementação com AGPI ω -3, os teores de colesterol total apresentaram uma redução no Tempo 2 (Figura 13), o mesmo acontecendo com os outros grupos. No que se refere aos teores de HDL-colesterol sérico (mg/dl) (Figura 14), não houve diferença notável, entre os grupos, nos diferentes tempos de

suplementação, à exceção de que houve um aumento do Grupo 1 do Tempo 0 para os Tempos 1 e 2 ($p < 0,05$), i.e., dos 0 aos 45 dias de suplementação. Com relação aos teores de LDL-colesterol sérico (mg/dl) (Figura 15), observa-se que houve uma redução para os grupos experimentais no Tempo 2 ($p < 0,05$). A redução do nível de LDL-colesterol sérico, aos 45 dias de suplementação com AGPI ω -3, está de acordo com outros estudos (Simons et al. 1985; Nestel, 1987; Drevon, 1992). Quanto aos teores de VLDL-colesterol (mg/dl) e triacilgliceróis (mg/dl) séricos (Figuras 16 e 17 respectivamente), houve um aumento significativo apenas do Grupo 5, em que os ratos receberam 1 g de AGPI ω -3, sem vitamina E, para proteção da oxidação, sendo que os demais grupos não apresentaram diferença significativa nos Tempos 0, 1 e 2 ($p > 0,05$). Assim, no presente estudo, houve aumento do nível sérico de HDL-colesterol, somente no caso dos ratos suplementados com óleo de soja, sendo que, nos demais grupos, os teores mantiveram-se constantes. Não houve variação dos teores de lípides totais, e, ao aumento do colesterol total aos 30 dias de suplementação, sobreveio uma redução aos 45 dias. Não obstante os valores absolutos, as variações, ao longo do tempo, dos teores de VLDL-colesterol e triacilgliceróis mostraram-se semelhantes.

Com relação ao perfil lipídico sérico, para o *segundo ensaio biológico*, observou-se que os teores de colesterol total sérico (mg/dl) (Figura 23) apresentaram um aumento no Tempo 2 em relação ao Tempo 0, com diferença significativa ($p < 0,05$). Por outro lado, os teores de HDL-colesterol (mg/dl) (Figura 24) e de LDL-colesterol séricos (mg/dl) (Figura 25) apresentaram uma redução no Tempo 2 em relação ao Tempo 0 e ao Tempo 1. Analisando-se os teores VLDL-colesterol (mg/dl) (Figura 26) e triacilgliceróis séricos (mg/dl)

(Figura 27), os resultados encontrados apresentaram um aumento no Tempo 1, ocorrendo posteriormente uma redução dos teores no Tempo 2, que não diferiram daqueles do “valor de referência” no Tempo 0. Portanto pôde-se notar que os valores encontrados para o perfil lipídico sérico, no *primeiro* e no *segundo ensaios biológicos*, foram diferentes, podendo-se apenas destacar, nos dois ensaios, a redução de LDL-colesterol sérico no Tempo 2 em relação ao Tempo 0 ($p < 0,05$).

No que se refere ao perfil lipídico hepático, para o *primeiro ensaio biológico*, observa-se que os teores de colesterol total (mg/dl) (Figura 18) não apresentaram diferença significativa durante a suplementação, e triacilgliceróis hepáticos (mg/g) (Figura 19), entre os grupos experimentais nos tempos de suplementação.

Tendo em vista os resultados encontrados para colesterol total e triacilgliceróis hepáticos, verificou-se que, para todos os grupos experimentais, à exceção do Grupo 2, no *segundo ensaio biológico*, os mesmos mostraram teores maiores para os Tempos 1 e 2, no *primeiro* e *segundo ensaios biológicos*, com relação aos “valores de referência” no Tempo 0.

Resultados encontrados por Song & Miyazawa (2001), mostraram que a suplementação com AGPI ω -3 não ocasionou diminuição nos teores de colesterol total, HDL-colesterol e LDL-colesterol no plasma, em ratos, com relação ao grupo controle; sendo que os teores de triacilgliceróis apresentaram uma redução com relação ao grupo controle. Chee et al. (1990) relataram que

o uso de cápsulas de AGPI ω -3 tem sido associado com a redução nos teores de triacilgliceróis plasmáticos. O mecanismo de inibição da secreção de triacilgliceróis pelos AGPI ω -3 de cadeia longa ocorre, provavelmente, através da redução da via de síntese do triacilgliceróis. Os resultados do perfil lipídico, encontrados no presente trabalho, diferiram de dados da literatura, uma vez que outras pesquisas mostraram que o uso da suplementação com AGPI ω -3 reduziu os teores de triacilgliceróis e colesterol plasmáticos (Harris, 1997; Hwang et al. 1997; Rambjor et al. 1996), reduzindo também as concentrações de VLDL-colesterol (Norum, 1992).

Os resultados encontrados com a suplementação com óleo de soja (Grupo 2) sugerem que a concentração de ácido α -linolênico, geralmente encontrado nesse óleo (aproximadamente 7%), foi capaz de produzir, embora em menor magnitude do que os AGPI ω -3, um efeito desejável em relação ao teor de LDL-colesterol que diminuiu.

No presente estudo, houve aumento do nível sérico de HDL-colesterol, no caso dos ratos suplementados com óleo de soja, sendo que, nos demais grupos, os níveis mantiveram-se constantes (Figura 14). Não houve variação dos níveis séricos de lípides totais, porém foi detectado um aumento do colesterol total, particularmente nos 30 dias de suplementação, VLDL-colesterol e triacilgliceróis. Contudo a redução do nível de LDL-colesterol sérico (Figura 15), aos 45 dias de suplementação, está de acordo com outros estudos (Simons et al. 1985; Nestel, 1987; Drevon, 1992).

O principal modelo adotado para estudo do metabolismo lipídico é o rato. A maioria das pesquisas em metabolismo lipídico visa a determinação do perfil das lipoproteínas plasmáticas (Suckling & Jackson, 1993). O metabolismo lipídico do rato foi estudado por vários pesquisadores. O'Farrell & Jackson (1997) e Mohamed et al. (2002) observaram o efeito da ingestão de ácidos graxos no fígado.

5.6 Consumo médio de dieta (g) e peso médio (g) dos animais

De acordo com os resultados obtidos no *primeiro e segundo ensaios biológicos*, com 45 dias de experimento, apresentados nas Figura 20 (A-B) e Figura 30 (A-B) respectivamente, que demonstram respectivamente o consumo médio de dieta por grupo experimental (g) e o peso médio (g) dos animais que receberam suplementação com AGPI ω -3 com e sem vitamina E, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p>0,05$) em cada tempo, mostrando que a suplementação a base de AGPI ω -3, com ou sem vitamina E, não interferiu nessas variáveis. Song & Miyazaura (2001) chegaram a resultados semelhantes quando suplementaram ratos com AGPI, e observaram que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos, em estudo, com relação ao ganho de peso dos animais.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados encontrados, podemos concluir que:

1. A suplementação com vitamina E (α -tocoferol) exerceu efeito protetor contra a peroxidação lipídica (sobre o nível de TBARS e do índice de peróxido) no sangue e no fígado dos ratos suplementados com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3.
2. Durante 45 dias de suplementação com AGPI ω -3, houve um aumento nos teores de ácidos graxos saturados palmítico e esteárico, ácido oléico e α -linolênico e docosahexaenóico, tanto ao nível sanguíneo como hepático, e um aumento do docosapentaenóico ao nível hepático. A adição da vitamina E não interferiu nos teores encontrados.
3. A suplementação com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 reduziu os teores de LDL-colesterol sérico dos ratos.
4. A suplementação com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 não reduziu os teores hepáticos de colesterol total, e triacilgliceróis dos ratos.
5. A vitamina E (tocoferóis totais) não interferiu no perfil lipídico dos ratos durante o período de suplementação.
6. A suplementação, à base de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, não interferiu nas médias do consumo de dieta e no ganho de peso dos ratos entre os grupos em estudo.

Tendo em vista os resultados encontrados, fica uma recomendação de que, ao fazer uso de suplementação com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, na forma concentrada, em cápsulas gelatinosas, a mesma deve estar associada à vitamina E para evitar os riscos de oxidação no nível celular e, com isso, causar efeitos danosos à saúde.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALESSIO, H. M. Exercise-induced oxidative stress. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Baltimore, v. 25, n.2, p.218-224, 1993.

ALLEN, J. C.; HAMILTON, R. J. **Rancidity in foods**. London: Appleid Science, 1983. 199p.

ANDO, K.; NAGATA, K.; BEPPU, M.; KIKUGAWA, K.; KAWABATA, T.; HASEGAWA, K.; SUZUKI, M. Effect of n-3 fatty acid supplementation on lipid peroxidation and protein aggregation in rat erythrocyte membranes. **Lipids**, Champaign, v.33, n.5, p.5005-5012, 1998.

ASCHERIO, A.; RIMM, E. B.; STAMPFER, M. J.; GIOVANNUCCI, E. L.; WILLET, W. C. Dietary intake of marine n-3 fatty acids, fish intake, and the risk of coronary disease among men. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.332, n.15, p.977-982, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the official chemistry**. 12. ed. Washington, 1975a. p.489.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the official chemistry**. 12. ed. Washington, 1975b. p.927-928.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the official chemistry**. 15. ed. Washington, 1990. 1141p.

AVIRAM, M. Modified forms of low density lipoproteins and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, Limerick, v.98, n.1, p.1-9, 1993.

BAGGA, D.; CAPONE, S.; WANG, H. J.; HEBER, D.; LILL, M.; CHAP, L.; GLASPY, J. A. Dietary modulation of omega-3/omega-6 polyunsaturated fatty acid ratios in patients with breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v.89, n.15, p.1123-1131, 1997.

BANG, H. O.; DYERBER, J.; NIELSEN, A. Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic west-coast Eskimos. **Lancet**, London, v.1, n.5, p.11143-1146, 1971.

BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M.; DESELMAN, C. J. A. Oxidants and antioxidants: State of the art. **The American Journal of Medicine**, Denver, v.91, n.30, suppl., p.3C-13S, 1991.

BELDA, M. C. R.; POURCHET-CAMPOS, J. Ácidos graxos essenciais em nutrição: Uma visão atualizada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.11, n.1, p.5-35, 1991.

BIRCH, E. E.; HOFFMAN, D. R.; CASTANELA, Y. S.; FAWCETT, S. L.; BIRCH, D. G.; UAUY, R. D. A randomized controlled trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of formula in term infants after weaning at 6 wk of age. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.75, n.3, p.570-580, 2002.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, n.8, p.911-917, 1959.

BONNES, T.; GUÉRIN, T. Is malonaldehyde a valuable index of peroxidation? **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.44, n.5, p.985-988, 1996.

BREIVIK, H. ω -3 concentrates: A Scandinavian view-point. AOCS short course. **Modern Application of Marine Oils**, Toronto, p.7-9, 1992.

BRONGEEST-SHOUTE, H. C.; VAN GENT, C. M.; LUTEN, J. B.; RUITTER, A. The effect of various intakes of n-3 fatty acids on the blood lipid composition in health human subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.34, p.1752-1757, 1981.

BRONTE-STEWART, B.; ANTONIS, A.; EALES, L.; BROCK, J. F. Effects of feeding different fats on serum-cholesterol level. **Lancet**, London, v.1, p.521-527, 1956.

BROWN, J. E.; WAHLE, K. W. J. Effect of fish-oil and vitamin E supplementation on lipid peroxidation and whole-blood aggregation in man. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v.193, p.147-156, 1990.

BUDOWSKI, P. ω 3 fatty acids in health and disease. World review of nutrition and dietetics aspects of human nutrition. **Advances in Food and Nutrition Research**, San Diego, v.57, p.214-374, 1988.

BURING, J. E.; HENNEKENS, C. H. Antioxidant vitamins and cardiovascular disease. **Nutrition Reviews**, Boston, v.55, n.1, suppl., p. 53S – 60S, 1997.

CELIK, S.; BAYDAS, G.; YILMAZ, O. Influence of vitamin e on the levels of fatty acids and MDA some tissues of diabetic rats. **Cell Biochemistry and Functions**, v.20, n.1, p.67-71, 2002.

CHAN, H. W. S.; COXON, D. T.; PEERS, K. E.; PRICE, K. R. Oxidative reactions of unsaturated lipids. **Food Chemistry**, Oxford, v.9, n.1, p.21-34, 1982.

CHEE, K. M.; GONG, J. X.; REES, D. M. G.; MEYDANI, M.; AUSMAN, L.; JOHNSON, J.; SIGUEL, E. N.; SCHAEFER, E. J. Fatty acid content of marine oil capsules. **Lipids**, Champaign, v.25, n.9, p.523-528, 1990.

CHO, S.; CHOI, Y. Lipid peroxidation and antioxidant status is affected by different vitamin E levels when feeding fish oil. **Lipids**, Champaign, v.29, n.1, p.47-52, 1994.

CONSELHO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (COI). **Azeite de oliva e a saúde**. Madrid, 1997. 110p.

CONTRERAS-GUZMÁN, E. S.; STRONG, F. C. Determination of tocopherols (vitamin E) by redution of cupric ion. **Journal of Association Official Analytical Chemists**, Easton, v.65, n.5, p.1215-1221, 1982.

DAGNELIE, P. P. C.; RIETVELD, T.; SWART, G. R.; STIJNEN, T.; BERG,

J. M. O. V. D. Effect of dietary fish oil on blood levels of free fatty acids, ketone bodies and triacylglycerol in humans. **Lipids**, Champaign, v.29, n.1, p.41-45, 1994.

DAHLE, L. K.; HILL, E. G.; HOLMAN, R. T. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.98, n.2, p.253-261, 1962.

DAVIDSON, S. Hyperlipidaemias, diet and plasma lipids. In: **Human nutrition and dietetics**. 7 ed., London, 1979. p.321-330.

DINIZ, D. B. **Parâmetros comportamentais e estresse oxidativo em cérebro de ratos submetidos a tratamento crônico de restrição energética ou suplementação com vitamina E**. 2000. 138p. Tese (Doutor em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DRAPER, H. H.; POLENSEK, L.; HADLEY, M.; MCGIRR, L. G. Urinary malondialdehyde as an indicator of lipid peroxidation in the diet and in the tissues. **Lipids**, Champaign, v.19, n.11, p.836-843, 1984.

DREVON, C. A. Marine oils and their effects. **Nutrition Reviews**, Boston, v.50, n.4, p.38-45, 1992.

DOUILLET, C.; BOST, M.; ACCOMINOTTI, M.; BORSON-CHAZOT, F.; CIAVATTI, M. Effect of selenium and vitamin E supplements on tissue lipids, peroxides, and fatty acid distribution in experimental diabetes. **Lipids**,

Champaign, v.33, n.4, p.393-399, 1998.

ESTERBAUER, H.; JURGENS, O.; QUENHENBERGER, M.; KOLLER, E. Antioxidation of human low density lipoprotein loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.28, n.5, p.495-509, 1987.

ESTERBAUER, H.; DEEBER-ROTHENEDER, M.; WALG, G.; RABL, H. Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL. **Annals of Medicine**, Helsinke, v.23, n.5, p.573-581, 1991.

ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.57, n.2, suppl., p.779S-786S, 1993.

EWIN, J. **O lado sadio das gorduras: ácidos graxos essenciais para uma vida e uma aparência saudáveis**. Rio de Janeiro: Campus, 1997. 162p.

FANTONI, C. M.; CUCCIO, A. P.; BARRERA-ARELLANO, D. Brazilian encapsulated fish Oil: oxidative stability and fatty acid composition. **Journal American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.16, n.2, p.251-253, 1996.

FAVIER, A. E. How to demonstrate the occurrence of an oxidative stress in human? In: FAVIER, A. E.; NEVE, J.; FAURE, P. **Trace elements and free radicals in oxidative diseases**. Champaign-Illinois: AOCS Press, 1994. p.99-117.

FERRARI, C. K. B. **Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos**:

mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.11, n.1, p.3-14, 1998.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FERRETTI, R.; DUARTE, R. A.; TERRA, N. L.; MORIGUCHI, Y. Aterosclerose e ácidos graxos ômega-3. **Acta Médica**, Porto Alegre, v.15, p.557-574, 1994.

FETT, C. A.; PETRICIO, A.; MAESTÁ, N.; CORREA, C.; CROCCI, A. J.; BURINI, R. C. Suplementação de ácidos graxos ômega-3 ou triglicerídios de cadeia média para indivíduos em treinamento de força. **Revista Motriz**, Rio Claro, v.7, n.2, p.83-91, 2001.

FITZGERALD, G. A.; PEDERSEN, A. K.; PATRONO, C. Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular disease. **Circulation**, Dallas, v.67, n.6, p.1174-1177, 1983.

FRANKEL, E. N. Lipid oxidation: mechanism, products and biological significance. **Journal American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.61, n.12, p.1908-1917, 1984.

FREI, B. Cardiovascular disease and nutrient antioxidants: Role of low density lipoprotein oxidation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.35, n.1/2, p.83-98, 1995.

FREI, B.; GAZIANO, T. M. Content of antioxidants preformed lipid hydroperoxides and cholesterol as predictors of the susceptibility of human LDL to metal ion-dependent and independent oxidation. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.34, n.12, p.2135-2145, 1993.

FRIAS, A. C. D. Utilização de ácidos graxos da família ômega-3 na prevenção de doenças cardiovasculares: revisão da literatura. **Boletim Cultural**, Bauru, v.19, 35p, 1995.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preoperative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, Washington, v.18, p.499-502, 1972.

GARRIDO, A.; GÁRATE, M.; CAMPOS, R.; VILLA, A.; NIETO, S.; VALENZUELA, A. Increased susceptibility of cellular membranes to the induction of oxidative stress after ingestion of high doses of fish oil: effect of aging and protective action of dl- α -tocopherol supplementation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Chapel Hill, v.4, p.118-122, 1993.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S.; OLIVIERA, C. A. F. Aspectos de qualidade do pescado de relevância em saúde pública. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.12, n.53, p.30-37, 1998.

GRANIT, R.; ANGEL, S.; AKIRI, B.; HOLZER, Z.; AHARONI, Y.; ORLOV, A.; KANNER, J. Effects of vitamin E supplementation on lipid peroxidation and color retention of salted calf muscle from a diet rich in polyunsaturated

fatty acids. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, v.49, n.12, p.5951-5956, 2001.

GRAY, J. I. Measurement of lipid oxidation: a review. **Journal American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.55, p.539-546, 1978.

GRUNDY, S. M.; DENKE, A. M. Dietary influences on serum lipoproteins. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.31, n.7, p.1149-1172, 1990.

GOENA, M.; MARZO, F.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A., L.; TOSAR, A.; FRUHRBECK, G.; SANTIDRIÁN, S. Effect of the raw legume *Vicia ervilia* on muscle and liver protein metabolism in growing rats. **Revista Española de Fisiología**, Pamplonia, v.2, n.45, suppl., p.55-60, 1989.

GUTTERIDGE, J. M. C. Invited Review. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. **Free Radical Research and Communications**, v.19, n.3, p.141-158, 1993.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **The American Journal of Medicine**, Denver, v.91, n.2, suppl., p.3C-30S, 1991.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: A personal view. **Nutrition Reviews**, Boston, v.52, n.8, p.253-265, 1994.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**,

Bethesda, v.57, suppl., p.715S-725S, 1993.

HALLIWELL, B.; MURCIA, M. A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O. I. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v.35, n.1/2, p.7-20, 1995.

HARATS, D.; DABACH, Y.; HOLLANDER, G.; BEN-NAIM, M.; SCHWARTZ, R.; BERRY, E. M.; STEIN, O.; STEIN, Y. Fish oil ingestion in smokers and nonsmokers enhances peroxidation of plasma lipoproteins. **Atherosclerosis**, Limerick, v.90, p.127-139, 1990.

HARRIS, W. S. Fish oil and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: critical review. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.30, n.6, p.785-807, 1997.

HARRIS, W. S.; CONNOR, W. E.; MCMURRY, M. P. The comparative reduction of the plasma lipids and lipoproteins by dietary polyunsaturated fats: salmon oil versus vegetable oils. **Metabolism**, v.32, n.2, p.179-184, 1983.

HARTMAN, L. S.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, London, v.22, n.7, p.475-476, 1973.

HAUG, A.; HOSTMARK, A. T. Lipoprotein lipases. Lipoproteins and tissue lipids in rats fed fish oil or coconut oil. **Journal of Nutrition**, Boca Raton, v.17, n.6, p.1011-1017, 1987.

HENNEKANS, C.; GAZIANO, J. M. Antioxidants and heart disease: Epidemiology and clinical evidence. **Clinical Cardiology**, Easton, v.16, n.4, suppl., p.I-10-I-15, 1993.

HEROLD, P. M.; KINZELLA, J. E. Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease: a comparison of findings from animal and human feeding trials ¹⁻³. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.43, n.4, p.566-598, 1986.

HILST, M. A. **Avaliação da estabilidade de óleo de soja acondicionado em latas e na embalagem tetra brik**. 1999. 101p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.

HIME, L. F. C. C. **Tratamento de pacientes pós-menopausa cardiopatas com ácido gama-linolênico**. 2000. 72p. Dissertação (Mestre em Saúde Pública) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

HSIEH, R. J.; KINSELLA, J. E. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: Mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. **Advances in Food and Nutrition Research**, San Diego, v.33, p.233-341, 1989.

HUDSON, B. J. F.; GORDON, M. H. Evaluation of oxidative rancidity. In: ALLEN, J. C.; HAMILTON, R. J. **Rancidity in Foods**. 3 ed. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1994.

HWANG, D. H.; CHANMUGAM, P. S.; RYAN, D. H.; BOUDREAU, M. D.; WINDHAUSER, M. M.; TULLEY, R. T.; BROOKS, E. R.; BRAY, G. A. Does

vegetable oil attenuate the beneficial effects of fish oil in reducing risk factors for cardiovascular disease? **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.66, n.1, p.89-96, 1997.

ILHA, J. C. G. Long-chain polyunsaturated fatty acids – Nutritional, technical and marketing aspects, In: SEMINÁRIO SOBRE ÓLEOS E GORDURAS: TENDÊNCIAS E INOVAÇÕES (SBOG), 4., 1999, São Paulo. **Proceedings.....**São Paulo, 1999. p.30-72.

INÉS, F.; BERMÚDEZ, M. J. N.; PALLARO, A. N.; SLOBODIANIK, N. H. Importância de los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 (API n-3) en la recuperación nutricional. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Chacao, v.49, n.1, p.26-30, 1999.

INTERNATIONAL FOOD INFORMATION COUNCIL (IFIC). **The food guide pyramide**. 1989. 98p.

JACKSON, M. J. Can dietary micronutrients influence tissue antioxidant capacity? **The Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v.53, n.1, p.53-57, 1994.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.9, p.515-540, 1990.

JOSEPH, J. A.; SHUKITT-HALE, B.; DENISOV, N. A.; PRIOR, R. L.; CAO, G.; MARTIN, A.; TAGLIALATELA, G.; BICKFORD, P. C. Long-term dietary

strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. **Journal of Neuroscience**, Oxford, v.18, n.19, p.8047-8055, 1998.

KANNER, J. Oxidative processes in meat and meat products: Quality implications. **Meat Science**, New York, v.36, n.1/2, p.169-189, 1994.

KANTER, M. Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.57, n.1, p.9-13, 1998.

KAYDEN, H.; TRABER, M. Absorption, lipoprotein transport and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.32, n.1, p.343-358, 1993.

KEYS, A.; ANDRESON, J. T.; GRANDE, F. "Essencial" fatty acids, degree of unsaturation, and effect of corn (maize) oil on the serum-cholesterol level in man. **Lancet**, London, v.1, p.66-68, 1957.

KINZELLA, J. E.; LOKESH, B.; STONE, R. A. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.52, n.1, p.1-28, 1990.

KIRK, J. R. Biological availability of nutrients in processed foods. **Journal of Chemical Education**, Easton, v.61, n.4, p.364-367, 1984.

KUBOW, S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation

products in foods. **Free Radical of Biology and Medicine**, New York, v. 12, n.1, p.63-81, 1992.

LANZILLOTTI, H. S. Aplicação da tecnologia de alimentos em alimentação coletiva. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.92/93, p.16-25, 2002.

LEIBOWITZ, B. E.; HU, M-L.; TAPPEL, A. L. Lipid peroxidation in rat tissue slices: effect of dietary vitamin E, corn oil-lard and menhaden oil. **Lipids**, Champaign, v.25, n.3, p.125-129, 1990.

LIN, C. C.; LIN, S. Y.; HWANG, L. S. Microencapsulation of squid oil with hydrophilic macromolecules of oxidative and thermal stabilization. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, n.1, p.36-39, 1995.

LIU, S. Y.; CHOY, S.; DEMBINSKI, T. G.; HATCH, G. M.; MYMIN, D.; SHEN, X.; ANGEL, A.; CHOY, P. C.; MAN, R. Alteration of lysophosphatidylcholine content in low density lipoprotein after oxidative modification: Relationship to endothelium dependent relaxation. **Cardiovascular Research**, London, v.28, n.10, p.1476-1481, 1994.

MAGNONI, C. D.; CUKIER, C. Terapia nutricional nas dislipidemias. **Programa Abbott de Especialização**, São Paulo, v.1, p.1-15, (suppl.), 2000.

McGUIRE, S. O.; FRITSCHKE, K. L. The effect of dietary menhaden fish oil on α -tocopherol status in rodents is both concentration and tissue dependent. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v.8, n.9, p.518-526, 1997.

MEAGHER, E. A.; BARRY, O. P.; LAWSON, J. A.; ROKACH, J.; FITZGERALD, G. A. Effects of vitamin E on lipid peroxidation in healthy persons. **JAMA**, Chicago, v.285, n.9, p.1178-1182, 2001.

MEYDANI, M.; NATIELLO, F.; GOLDIN, B.; FREE, N.; WOODS, M.; SCHAEFER, E.; BLUMBERG, J. B.; GORBACH, S. L. Effect of long-term fish oil supplementation on vitamin E status and lipid peroxidation in women. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.121, p.484-491, 1991.

MIYAZAWA, T. Determination of phospholipid hydroperoxides in human blood plasma by a chemiluminescence-HPLC assay **Free Radical of Biology and Medicine**, New York, v.7, p.209-217, 1999.

MOHAMED, A. I.; HUSSEIN, A. S.; BHATHEMA, S. J.; HAFEZ, Y. S. The effect of dietary menhaden, olive, and coconut oil fed with three levels of vitamin E on plasma and liver lipids and plasma fatty acid composition in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Chapel Hill, v.13, p.435-441, 2002.

MORAES, T.; SANTOS, J. E. Lipídeos. In: DUTRA DE OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, S. **Ciências Nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998. p.87-97.

MORTENSEN, J. Z.; SCHMIDI, E. B.; NIELSEN, A. H.; DYERBERG, J. The effects of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on hemostasis, blood lipids and blood pressure. **Thrombosis and Haemostas**, New York, v.50, n.2, p.534-546, 1983.

MOSS, G. P. Nomenclature of tocopherols and related compounds. In:

Biochemical nomenclature and related documents. 2 ed., 1992, p.239-241.

MOURI, K.; IKESU, H.; ESAKA, T.; IGARASHI, O. The influence of marine oil intake upon levels of lipids, α -tocopherol and lipid peroxidation in serum and liver of rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v.30, n.4, p.307-318, 1984.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.29, n.4, p.273-300, 1990.

NAWAR, W. Lipids. In: FENNEMA, O.R. (Ed.). **Food chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1985. p.139-144.

NAWAR, W. W. **Lipids food chemistry**. 3 ed. New York: Marcel Dekker, 1996. 1069p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 3 ed. New York. 2000.

NESTEL, P. J. Polyunsaturated fatty acids (n-3, n-6). **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 45, n.5, p.1161-1167, 1987.

NICOLOSI, R. J.; WILSON, T.A.; LAWTON, C.; ROGERS, E. J.; WISEMAN, S. A.; TIJBURG, L. B. M.; KRITCHEVSKY, D. The greater atherogenicity of nonpurified diets versus semipurified diets in hamsters is mediated via differences in plasma lipoprotein cholesterol distribution, LDL oxidative susceptibility, and plasma α -tocopherol concentration. **The Journal**

of Nutritional Biochemistry, New York, v.9, n.10, p.591-597, 1998.

NIKI, E. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. **Lipids**, Champaign, v.22, p.220-225, 1987.

NORDØY, A.; DYERBERG, J. Introduction n-3 fatty acids in health and disease. **Journal of Internal Medicine**, New York, v.225, n.1, suppl., p.1-3, 1989.

NORUM, R. K. Dietary fat and blood lipids. **Nutrition Reviews**, Boston, v.50, n.4, p.30-34, 1992.

NOSSEN, J. O.; RUSTAN, A. C.; GLOPPESTAD, S. H.; MALBAKKEN, S.; DREVON, C. A. Eicosapentaenoic acid inhibits synthesis and secretion of triacylglycerols by cultured rat hepatocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.879, n.1, p.56-65, 1986.

O'FARRELL, S.; JACKSON, M. J. Dietary polyunsaturated fatty acids, vitamin E and hypoxia/reoxygenation-induced damage to cardiac tissue. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v.267, n.2, p.197-211, 1997.

OLIVEIRA, S. L. **Restrição calórica e suplementação com vitamina E no rato submetido ao exercício físico exaustivo**. 1999. 114p. Tese (Doutor em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PACCHIONI, V. M. Ácidos graxos essenciais ômega-3 e ômega-6 e sua

utilização em alimentos funcionais. **Food Ingredients**, São Paulo, v.1, n.1, p.24-25, 1999.

PACKER, L. Nutrition and biochemistry of the lipophilic antioxidants vitamin E and carotenoids. In: ONG, A. S. H.; NIKI, E.; PACKER, L. **Nutrition, lipids, health and disease**. Champaign: AOCS Press, 1995. cap. 2, p.8-35.

PAPAS, A. M. Determinants of antioxidant status in humans. **Lipids**, Champaign, v.31, suppl., p.77S-82S, 1996.

PARTHASARATHY, S., KHOO, J. C., MILLER, E., BARNETT, J., WITZTUM, J., STEINBERG, D. Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modifications: Implications for dietary prevention of atherosclerosis. **Proceeding National Academy Science USA**, Washington, v.87, n.8, p.3894-3898, 1990.

PELLET, P. L.; YOUNG, V. R. **Nutrition evaluation of protein foods**. Tokyo: The United Nations University, 1980. p.154.

POLLONIO, M. A. R. Alimentos funcionais: recentes tendências e os aspectos de segurança envolvidos no consumo. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.74, p.26-31, 2000.

PRYOR, W. A.; STANLEY, J. P.; BLAIR, E. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. **Lipids**, Champaign, v.11, p.370-379, 1976.

RAMBJOR, G. S.; WALEN, A. I.; WINDSOR, S. L.; HARRIS, W. S. Eicosapentaenoic acid is primarily responsible for hypotriglyceridemic effect of fish oil in humans. **Lipids**, Champaign, v.31, n.1, suppl., p. 45S-50S, 1996.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.1, n.11, p.1939-1951, 1993.

SAITO, M.; NAKATSUGAWA, K. Increased susceptibility of liver to lipid peroxidation after ingestion of a high fish oil diet. **International Journal of Vitaminology Nutrition Research**, Bern, v.64, p.144-151, 1994.

SAITO, M.; KUBO, K.; IKEGAMI, S. An assessment of docosahexaenoic acid (DHA) intake with special reference to lipid metabolism in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v.42, n.3, p.195-207, 1996.

SANDERS, T. A. B; HOCHLAND, M. C. A comparison of the influence on plasma lipids and platelet function of supplements of ω -3 and ω -6 polyunsaturated fatty acids. **The British Journal Nutrition**, London, v.50, n.3, p.521-529, 1983.

SANTIDRIÁN, S.; GOENA, M.; CUEVILLAS, F.; LARRALDE, J. Muscle protein synthesis of rats fed a kidney bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) diet. **Revista Española de Fisiología**, Pamplonia, v.1, n.44, p.109-110, 1988.

SAYNOR, R. Effects of ω -3 fatty acids on serum lipids. **Lancet**, London, v.1,

p.696-697, 1984.

SCHECHTMAN, G.; KAUL, S.; KISSEBAH, A. Heterogeneity of low density lipoprotein responses to fish oil supplementation in hypertriglyceridemic subjects. **Arteriosclerosis**, Limerick, v.9, p.345-354, 1989.

SEVANIAN, A.; HOCHSTEIN, P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. **Annuals Review Nutrition**, v.5, p.365-390, 1985.

SIMIC, M. G.; JAVANOVIC, S. V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. In: HO, C. T.; OSAWA, T.; HUANG, T. M.; ROSEN, R. T. (Ed.). **Food phytochemicals for cancer prevention**. Washington: American Chemical Society, 1994. p.20-33.

SIMONS, L. A.; HICKIE, J. B.; BALASUBRAMANIAM, S. On the effects of dietary n-3 fatty acids (Maxepa) on plasma lipids and lipoproteins in patients with hyperlipidaemia. **Atherosclerosis**, Limerick, v.54, n.1, p.75-88, 1985.

SINGH, R. P.; HELDMAN, D. R.; KIRK, J. R. Kinetics of quality degradation: ascorbic acid oxidation in infant formula during storage. **Journal Food Science**, Chicago, v.41, p.304-308, 1976.

SINNHUBER, R. O.; YU, T. C. 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. **Food Tecnology**, Chicago, v.12, p.9-12, 1977.

SILVA, S. M. C. S. Implicações nutricionais das gorduras rancificadas. **Óleos e Grãos**, São Paulo, v.8, n.37, p.35-37, 1997.

SIU, G. M.; DRAPER, H. H. Metabolism of malonaldehyde *in vivo* and *in vitro*. **Lipids**, Champaign, v.17, p.349-355, 1982.

SHAHIDI, F. Stability of fats and oils. In: LATIN AMERICAN CONGRESS AND EXHIBITION ON FATS AND OILS PROCESSING, 1995, Campinas, **Proceedings...**, Campinas, 1995. p.47-54.

SHIMIZU, T.; IGARASHI, J.; OHTUKA, Y.; OGUCHI, S.; KANEKO, K. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E on colonic mucosal leucotriene generation, lipid peroxidation, and microcirculation in rats with experimental colitis. **Digestion**, Basel, v.63, n.1, p.49-54, 2001.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.15, n.1, p. 71-81, 2002.

SODERGREN, E.; CEDERBERG, J.; VESSBY, B.; BASU, S. Vitamina E reduces lipid peroxidation in experimental hepatotoxicity in rats. **European Journal of Clinical Nutrition**, Basingstoke, v.40, n.1, p.10-16, 2001.

SONG, J. H.; MIYAZAWA, T. Enhanced level of n-3 fatty acid in membrane phospholipids induces lipid peroxidation in rats fed dietary docosahexaenoic acid oil. **Atherosclerosis**, Limerick, v.155, n.1, p.9-18, 2001.

STAESSEN, L.; DEBACQUER, D.; DEHENAuw, S.; DEBACKER, G.;

VAN-PETEGHEM, C. Fatty acid composition of the Belgian diet: estimates derived from the Belgian Interuniversity Research on nutrition and health. **Annals of Nutrition and Metabolism**, Basel, v.42, p.151-159, 1998.

STEINBRECHER, M. D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T. E.; KHOO, J. C.; WITZTUM, J. L. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **The New England Journal of Medicine**, Toronto, v.320, n.14, p.915-924, 1989.

SUAREZ, A.; RAMÍREZ-TORTOSA, M.; GIL, A.; FAUS, M. J. Addition of vitamin E to long-chain polyunsaturated fatty acid-enriched diets protects neonatal tissue lipids against peroxidation in rats. **European Journal of Clinical Nutrition**, Basingstone, v.38, n.4, p.169-175, 1999.

SUCLING, K. E.; JACKSON, B. Animal models of human lipid metabolism. **Lipids**, Champaign, v.28, n.1, p.1-24, 1993.

TAKEMOTO, E. **Óleos. Secção de óleos, gorduras e condimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1999. 130p.

TARLADGIS, B. G.; WATTS, B. M.; YOUNATHAN, T. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. **Journal American Oil Chemists'Society**, Champaign, v.37, n.1, p.44-48, 1960.

TIDUS, P. M.; BEHUNS, W. A.; MADERE, R. Effects of vitamin E status and exercise training on tissue lipid peroxidation based on two methods of assessment. **Nutrition Research**, Elmsford, v.13, suppl., p.189S-193S, 1993.

UAUY, R.; VALENZUELA, A. Marine oils as a source of omega-3 fatty acids in the diet: how to optimize the health benefits. **Progress in Food and Nutrition Science**, Canada, v.16, n.3, p.194-243, 1992.

VALENZUELA, A. The biological significance of malonaldehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. **Life Sciences**, Oxford, v.48, n.4, p.301-309, 1991.

VALENZUELA, A.; NIETO, S.; UAUY, R. Desafios tecnológicos para avaliar ácidos graxos ômega-3 polinsaturados em óleos marinhos de uso alimentício e farmacológico. **Aceites e Graxas**, Sevilla, v.7, 1993.

VALENZUELA, A. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en la nutrición y la prevención de enfermedades. **Boletín LC PUFA (LC-polyunsaturated fatty acids)**, n.1, 1999.

VANNUCCHI, H.; MENEZES, E. W.; CAMPANA, A. O.; LAJOLO, F. M. Aplicações das recomendações nutricionais brasileiras. **Cadernos de Nutrição**, Ribeirão Preto, v.2, p.1-156, 1990.

VANNUCCHI, H.; CAMPANA, A. O. Importância dos óleos de peixe em nutrição e fisiologia humana. **Cadernos de Nutrição**, Ribeirão Preto, v.3, p.41-97, 1991.

VATASSERY, G. T.; FAHN, S.; KUSKOWSKI, M. A. Alpha tocopherol in CFS of subjects taking high-dose vitamin E in the DATATOP study. **Neurology**, Minneapolis, v.50, p.1900-1902, 1998.

VERGARA, M. C. LC-PUFAs Ômega-3: conceitos e tecnologia de aplicação. Caderno de Tecnologia de Alimentos & Bebidas. In: **Food Ingredients**, São Paulo, ano 1, n.4, p.77-79, 2000.

VOGNILD, E.; ELVEVOLL, BROX, J.; OLSEN, R. L.; BARSTAD, H.; AURSAND, M.; OSTERUD, B. Effects of dietary marine oils and olive oil on fatty acid composition , platelet membrane fluidity, platelet responses, and serum lipids in healthy humans. **Lipids**, Champaign, v.33, n.4, p.427-436, 1998.

VOSS, M. Ácidos graxos ômega-3. **Atualidades Dietéticas**, São Paulo, v.1, n.1, p.1-6, 1994.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Stabilization of seal blubber and manhaden oils with green tea catechins. **Journal American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.73, n.9, p.1183-1190, 1996.

WANG, F. S.; JIANG, Y. N.; LIN, C. W. Lipid and cholesterol oxidation in Chinese-style sausage using vacuum and modified atmosphere packaging. **Meat Science**, Barking, n.1, v.40, p.93-101, 1995.

WASOWICZ, W.; NEVE, J.; PERETZ, A. Optimized steps in fluorimetric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. **Clinical Chemistry**, Washington, v.39, n.12, p.2522-2600, 1993.

WEINDRUCH, R. Caloric restriction and aging. **Scientific American**, New

York, v.274, n.1, p.32-38, 1996

WILLIAMS, P. C. The use of titanium dioxide as catalyst for large-scale kjeldahl determination of the total nitrogen content of cereal grains. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.24, n.4, p.343-348, 1973.

WISEMAN, H. Dietary influences on membrane function: importance in protection against oxidative damage and disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, n.1, v.7, p.2-15, 1996.

YAM, D.; PELED, A.; HUSZAR, M.; SHINITZKY, M. Dietary fish oil suppresses tumor growth and metastasis of lewis lung carcinoma in mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v.8, n.11, p.619-622, 1997.