

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Caracterização do Óleo da Polpa de Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) e Azeite de Oliva (*Olea europaea* L.) Virgem Extra e Seus Efeitos Sobre Dislipidemia e Outros Parâmetros Sanguíneos, Tecido Hepático e Mutagênese Em Ratos *Wistar*

Autor: Marcio Aoqui
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Palma Favaro
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Susana Elisa Moreno

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Junho-2012

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Caracterização do Óleo da Polpa de Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) e Azeite de Oliva (*Olea europaea* L.) Virgem Extra e Seus Efeitos Sobre Dislipidemia e Outros Parâmetros Sanguíneos, Tecido Hepático e Mutagênese Em Ratos *Wistar*

Autor: Marcio Aoqui

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Palma Favaro

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Susana Elisa Moreno

“Defesa apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde”

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Junho-2012

Aoqui, Márcio.

Caracterização do Óleo da Polpa de Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) e Azeite de Oliva (*Olea europaea* L.) Virgem Extra e Seus Efeitos Sobre Dislipidemia e Outros Parâmetros Sanguíneos, Tecido Hepático e Mutagênese Em Ratos *Wistar* / Márcio Aoqui; Campo Grande – MS, 19 de Junho de 2012. 122 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Católica Dom Bosco,
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biotecnologia.
Orientadora: Simone Palma Favaro
Co-Orientadora: Susana Elisa Moreno

1. Óleo da polpa de macaúba 2. Azeite de oliva virgem extra 3. Caracteres físico-químicos 4. Cromatografia em fase gasosa 5. Índices de qualidade nutricional 6. Ratos *Wistar* 7. Dislipidemias 8. Análises Bioquímicas 9. Anatomopatológico de fígado 10. Mutagênese 11. Parâmetros corporais
I. Favaro, Simone Palma II. Moreno, Susana Elisa
III. Universidade Católica Dom Bosco IV. Título.



MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO
UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Caracterização do Óleo da Polpa de Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) e Azeite de Oliva (*Olea europaea* L.) Virgem Extra e Seus Efeitos Sobre Dislipidemia e Outros Parâmetros Sanguíneos, Tecido Hepático e Mutagênese Em Ratos *Wistar*

Autor: Marcio Aoqui

Orientador: Prof^a. Dr^a. Simone Palma Favaro

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a Susana Elisa Moreno

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia - Área de concentração:
Biotecnologia Aplicada à Saúde.

APROVADO em 19 de Junho de 2012.

Prof^o. Dr^o. Cristiano Marcelo Espínola Carvalho - UCDB

Prof^a. Dr^a. Simone Mendonça – Embrapa Agroenergia

Prof^a. Dr^a. Simone Palma Favaro
(Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Susana Elisa Moreno
(Co-Orientadora)

“A nossa vida é enriquecida conforme o número de sonhos, desejos, esperanças e aspirações que conseguimos tornar realidade”.

(LE CORBUSIER)

A família com amor, **DEDICO**.

À minha esposa Andreia de Sousa Aoqui, pelo seu amor, compreensão, paciência, e pelo simples fato de estar presente na minha vida, me acompanhando nos momentos mais difíceis...

Aos meus filhos Isabella de Sousa Aoqui e Eduardo Henrique de Sousa Aoqui, cuja alegria de viver não me deixa desistir de sonhar e lutar pela felicidade e ideais....

Aos meus pais, pela sabedoria em educar e por todo amor demonstrado nos momentos onde não parecia haver mais esperança.

Ao meu irmão por acreditar em mim. Sem sua ajuda, jamais chegaria onde estou.

A Deus por estar sempre presente em minha vida...

Minha Gratidão...

AGRADECIMENTOS

“Primeiramente a Deus, pelas bênçãos derramadas durante toda a minha vida”.

Agradeço a todos que tornaram possível a realização deste trabalho, com especial atenção:

À empresa RM, em oferecer suas instalações e equipamentos para o despolpamento e a extração do óleo da polpa de macaúba.

Ao Bio Diagnostic Laboratório Clínico Ltda e Ultramedical Centro de Diagnósticos em Medicina, pela realização dos ensaios de bioanálises em Bioquímica Clínica e Patologia Clínica.

À Universidade Católica Dom Bosco, por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco.

À Prof^a. Dr^a. Simone Palma Favaro pela sabedoria em orientar, pela paciência em instruir e pela dedicação e sugestões nesse trabalho. Esses valiosos ensinamentos foram os pilares da conclusão dessa dissertação.

À Prof^a. Dr^a. Susana Elisa Moreno por mostrar que a ética e o respeito pelos animais utilizados nesse trabalho, são os princípios primordiais para um bom direcionamento e desempenho nas pesquisas quando utilizamos animais experimentais.

Ao Prof^o Albert Schiaveto de Souza por orientar nos trabalhos de estatística dessa dissertação.

À Prof^a Dr^a Márcia Maria Silva, Patologista Clínica da Ultramedical Centro de Diagnósticos em Medicina, pelas análises de anatomopatológico dos fígados dos ratos *Wistar*.

A todos os profissionais do Biotério/UCDB, pela presteza e pelo fornecimento dos animais.

Às Mestres em Biotecnologia Brunna Mary Okubo e Danieli Fernanda Buccini pela realização dos ensaios de mutagênese e nas manipulações dos animais (eutanásia e dissecação).

À mestre Gabrielly Ciconini pela ajuda nos ensaios de cromatografia em fase gasosa.

Ao Farmacêutico-Bioquímico Alexandre Augusto Tutes, do Bio Diagnostic Laboratório Clínico LTDA, na condução das dosagens laboratoriais dos componentes séricos, dados importantes para a conclusão dessa dissertação.

Ao acadêmico de Nutrição, Gustavo Agrímpio, pela ajuda na extração do óleo da polpa de macaúba e na manutenção dos animais.

Ao acadêmico de Biologia, Frederico Nakasone Ferreira, pela ajuda na eutanásia e dissecação dos animais.

Ao técnico de laboratório do Bio Diagnostic Laboratório Clínico LTDA, João Barreto Catú Ottellinger, na coleta dos frutos de macaúba no município de Rochedo, estado de Mato Grosso do Sul.

À técnica de laboratório Maria Helena de Araújo da UCDB, nos ensaios laboratoriais dos caracteres físico-químicos dos óleos e na manipulação com animais.

Aos colegas mestrandos Críssia Fernanda Tapeti de Souza e Gabriel Pinheiro dos Santos pela ajuda nos momentos difíceis.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Biotecnologia da UCDB, pelos valiosos ensinamentos.

Aos colegas de curso, pela amizade, apoio e pela demonstração de companheirismo.

Aos técnicos e funcionários da UCDB, que ajudaram no suporte administrativo e especializado durante este curso.

Aos animais, pelo sacrifício em favor do desenvolvimento científico.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado !

BIOGRAFIA DO AUTOR

MÁRCIO AOQUI, filho de Massatuque Aoqui e de Tizuko Aoqui, nasceu em Araçatuba, estado de São Paulo aos 16 dias do mês de junho de 1967. Casado com a senhora Andreia de Sousa Aoqui e tem dois filhos, Isabella de Sousa Aoqui e Eduardo Henrique de Sousa Aoqui.

Em dezembro de 1991, concluiu em grau de bacharel, o curso de Farmácia, com especialidade em Bioquímica, conferido pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Em Abril de 1994, junto com o Dr^o Agnaldo Ramos Omido e o Dr^o Anísio Aparecido Chacom fundaram o Bio Diagnostic Laboratório Clínico LTDA.

Em 1996 foi aprovado no concurso público federal para a Escola de Saúde do Exército no curso de formação de Oficiais de carreira do serviço de saúde do Exército brasileiro.

Em 1997, concluiu em grau de especialista no curso de Homeopatia conferido pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Em 1997 concluiu o curso de formação de Oficiais de carreira Médicos, Farmacêuticos e Dentistas pela Escola de Saúde do Exército na cidade do Rio de Janeiro-RJ, com a patente de 1^o Tenente Farmacêutico. Diário Oficial da União (DOU) 02 de dezembro de 1997, página 8, Seção 2.

Durante a carreira militar desempenhou diversos cargos de chefia nos seguintes estabelecimentos militares:

- Coimbra-MS (3^a Companhia de Fronteira e Forte de Coimbra) – Subcomandante, chefe do posto médico, chefe do laboratório análises clínicas, chefe da farmácia, chefe da estação de tratamento de água, chefe da 3^a seção (S3) instrução da tropa, chefe da 4^a seção (S4) setor administrativo, presidente da comissão de licitação e contratos, gestor do hotel de trânsito, chefe da seção mobilizadora e oficial de relações públicas.

- Hospital Geral de Campo Grande (HGeCG) – Hospital Geral do Exército – Adjunto ao Laboratório de Análises Clínicas (LAC), Responsável pelo setor de Hematologia do LAC, responsável pelo setor de Bioquímica Clínica do LAC, Chefe da seção de Relações Públicas, Chefe da Conformidade de Área, Chefe da Farmácia hospitalar.

Em 2001 foi condecorado com a medalha com passador de bronze e promovido ao posto de Capitão Farmacêutico. Diário Oficial da União (DOU) 26 de dezembro de 2001, página 9, Seção 2.

Em 2004 a 2008 foi nomeado Diretor Geral da Escola Nikken Objetivo, escola de nível fundamental e médio, na cidade de Yokkaichi, província de Mie-Ken no Japão, parecer CEB/CNE nº 8/2007, 19/04/2007, publicado no Diário Oficial da União (DOU) de 02/07/2007, sob ordem do Ministério da Educação e Cultura do Brasil e do Conselho Nacional de Educação.

Atualmente é sócio-diretor do Bio Diagnostic Laboratório Clínico LTDA.

Em Março de 2010, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, em nível de Mestrado, área de concentração Biotecnologia Aplicada à Saúde, na Universidade Católica Dom Bosco, realizando na área a caracterização do óleo da polpa de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) e azeite de oliva (*Olea europaea* L.) virgem extra e seus efeitos sobre dislipidemia e outros parâmetros sanguíneos, tecido hepático e mutagênese em ratos *Wistar*.

No dia 19 de Junho de 2012, submeteu-se à banca para a defesa da Dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE EQUAÇÕES.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	03
2.1 Lipídeos.....	03
2.2 Ácidos Graxos.....	06
2.3 Ácidos Graxos Essenciais.....	11
2.4 Triacilglicerídeos.....	13
2.5 Colesterol.....	14
2.6 Lipoproteínas.....	16
2.6.1 Lipoproteína de Muito Baixa Densidade – VLDL.....	18
2.6.2 Lipoproteína de Baixa Densidade – LDL.....	19
2.6.3 Lipoproteína de Alta Densidade – HDL.....	20
2.7 Aspectos Metabólicos dos Lipídeos.....	21
2.7.1 Ciclo Exógeno.....	21
2.7.2 Ciclo Endógeno.....	22
2.8 Metabolismo das Lipoproteínas.....	23
2.9 Doenças Cardiovasculares.....	24
2.9.1 Fatores de Risco das Doenças Cardiovasculares.....	26
2.9.2 Nutrição e Dieta nas Coronariopatias.....	26
2.10 Azeite de Oliva (<i>Olea europaea</i> L.) Virgem Extra – Propriedades Físico-Químicas e Terapêuticas.....	28
2.10.1 Dieta do Mediterrâneo.....	34
2.11 Macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.).....	36
2.11.1 Características Botânicas da Macaúba.....	37
2.11.2 Distribuição.....	39
2.11.3 Fruto.....	40
2.11.4 Polpa da Macaúba.....	42
3. OBJETIVOS.....	46
3.1 Objetivo Geral.....	46
3.2 Objetivos Específicos (Capítulo 2).....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

4 . CAPÍTULO 2.....	60
4.1 Caracterização do Óleo da Polpa de Macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.) e Azeite de Oliva (<i>Olea europaea</i> L.) Virgem Extra e Seus Efeitos Sobre Dislipidemia e Outros Parâmetros Sanguíneos, Tecido Hepático, Parâmetros Corporais e Mutagênese Em Ratos Wistar.....	60
4.2 Resumo.....	60
4.3 Introdução.....	61
4.4 Material e Métodos.....	62
4.5 Resultados.....	74
4.6 Discussão.....	95
4.7 Conclusão.....	99
4.8 Agradecimentos.....	100
4.9 Referências Bibliográficas.....	101
4.10 Considerações Finais.....	107
4.11 Normas da Revista Científica Biochimie.....	108

LISTA DE TABELAS

	Páginas
<u>CAPÍTULO 1</u>	
Tabela 1. Nomenclatura e propriedades física de ácidos graxos..	07
Tabela 2. Características e fontes de ácidos graxos.....	07
Tabela 3. Definição das lipoproteínas com base nas faixas de densidade das apoproteínas.....	16
Tabela 4. Valores de referência dos lipídios sanguíneos.....	24
Tabela 5. Limites de tolerância de parâmetros de qualidade dos azeites e óleos de oliva.....	30
Tabela 6. Limites de tolerância de parâmetros de identidade dos azeites de oliva.....	31
Tabela 7. Limites de parâmetros de identidade e qualidade para azeites de oliva.....	32
Tabela 8. Indicadores de produtividade da macaúba na Zona da Mata, considerando sistema silvipastoril no espaçamento 5 x 5 m (400 plantas/ha).....	42
Tabela 9. Composição centesimal da polpa de macaúba – <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd ex Mart., expressa em g.100g ⁻¹ de amostra úmida	43
Tabela 10. Composição de ácidos graxos (%) da polpa <i>in natura</i> , farinha de polpa e do óleo de amêndoa da macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.) do estado de Mato Grosso do Sul.....	44
<u>CAPÍTULO 2</u>	
Tabela 1. Composição química da ração padrão para ratos e camundongos.....	63
Tabela 2. Composição química ração hipercolesterolêmica para ratos e camundongos.....	64
Tabela 3. Caracterização físico-química de óleo da polpa de macaúba e azeite de oliva virgem extra.....	75
Tabela 4. Perfil dos ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa do óleo da polpa de macaúba, azeite de oliva virgem extra, frações lipídicas das rações padrão e hipercolesterolêmica.....	79
Tabela 5. Índices de qualidade nutricional de óleos em diferentes fontes.....	81
Tabela 6. Perfil lipídico em ratos <i>Wistar</i> machos alimentados com ração hipercolesterolêmica e suplementados com óleo de oliva virgem extra ou óleo da polpa de macaúba.....	83
Tabela 7. Perfil hepático em ratos <i>Wistar</i> machos alimentados com ração hipercolesterolêmica e suplementados com óleo de oliva virgem extra ou óleo da polpa de macaúba.....	84

Tabela 8. Glicemia e perfil renal em ratos <i>Wistar</i> machos alimentados com ração hipercolesterolêmica e suplementados com óleo de oliva virgem extra ou óleo da polpa de macaúba.....	85
Tabela 9. Eletrólitos em ratos <i>Wistar</i> machos alimentados com ração hipercolesterolêmica e suplementados com óleo de oliva virgem extra ou óleo da polpa de macaúba.....	86
Tabela 10. Parâmetros corporais em ratos <i>Wistar</i> machos induzidos à hipercolesterolemia e suplementados com óleo de oliva virgem extra ou óleo de macaúba.....	87
Tabela 11. Magnitude de alteração anatomopatológica em tecido hepático de ratos <i>Wistar</i> machos induzidos à hipercolesterolemia e suplementados com óleo de oliva virgem extra e óleo da polpa de macaúba.....	88
Tabela 12. Perfil lipídico de ratos <i>Wistar</i> machos induzidos à hipercolesterolemia com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementação com óleo da polpa de macaúba ou azeite de oliva virgem extra.....	90
Tabela 13. Perfil hepático de ratos <i>Wistar</i> machos induzidos à hipercolesterolemia com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementação com óleo da polpa de macaúba ou azeite de oliva virgem extra	91
Tabela 14. Glicemia e perfil renal de ratos <i>Wistar</i> machos induzidos à hipercolesterolemia com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementação com óleo da polpa de macaúba ou azeite de oliva virgem extra.....	92
Tabela 15. Eletrólitos em ratos <i>Wistar</i> machos induzidos à hipercolesterolemia com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementação com óleo da polpa de macaúba ou azeite de oliva virgem extra.....	92
Tabela 16. Parâmetros corporais de ratos <i>Wistar</i> machos induzidos à hipercolesterolemia com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementação com óleo da polpa de macaúba ou azeite de oliva virgem extra.....	93
Tabela 17. Magnitude de alteração anatomopatológica em tecido hepático de ratos <i>Wistar</i> machos induzidos à hipercolesterolemia com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguida de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementados ou não com óleo da polpa de macaúba ou azeite de oliva.....	94

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
<u>CAPÍTULO 1</u>	
Figura 1. Breve levantamento das diferentes classes de lipídeos	04
Figura 2. Formação de um triacilglicerol por reação de esterificação entre três moléculas de ácidos graxos e uma de glicerol	05
Figura 3. Ácido graxo com grupamento metil e carboxílico em lados opostos.....	06
Figura 4. Representação esquemática de ácidos graxos saturado e insaturado; (a) ácido graxo saturado - ácido esteárico 18:0 e (b) ácido graxo insaturado - ácido oléico 18:1(Δ^9)	09
Figura 5. Representação esquemática dos ácidos graxos poliinsaturados essenciais – ômega-3 e ômega-6	12
Figura 6. Metabolismo dos ácidos graxos das famílias ômega-6 e ômega 3.....	13
Figura 7. Modelo estrutural da molécula de colesterol.....	14
Figura 8. Papel central de colesterol na produção de compostos fisiologicamente ativos.....	15
Figura 9. Visão esquemática do metabolismo das lipoproteínas e o transporte de lipídeos.....	18
Figura 10. Estrutura da lipoproteína de baixa densidade (LDL). A apolipoproteína B-100 (apoB-100) é uma das maiores cadeias polipeptídicas conhecida, com 4.636 resíduos de aminoácidos (Mr 513.000). Uma partícula de LDL contém um núcleo com 1.500 moléculas de ésteres de colesterol, rodeado por cerca de 500 moléculas de colesterol, 800 moléculas de fosfolipídeos, e uma molécula de apoB-100	19
Figura 11. A heterogeneidade funcional da lipoproteína de alta densidade. Estudos recentes demonstram a variedade de funções da HDL, que era conhecida somente por seu papel no transporte de lipídeos	21
Figura 12. Macaúba – <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.; Base das bainhas foliares, cobertas de espinhos escuros e compridos.....	38

Figura 13. Inflorescência da macaúba com proteção (espata).....	39
Figura 14. Estruturas do Fruto da Macaúba.....	40

CAPÍTULO 2

Figura 1. Ração hipercolesterolêmica para ratos e camundongos (A) e ração padrão para ratos e camundongos (B).....	64
Figura 2. Óleo da polpa de macaúba.....	65
Figura 3. Punção intra-cardíaca em ratos <i>Wistar</i> macho.....	72
Figura 4. Tecido adiposo visceral retirado de rato <i>Wistar</i> macho.....	73
Figura 5. Eritrócitos micronucleados.....	74
Figura 6. Fígado de ratos <i>Wistar</i> macho alimentados com ração padrão (A) e alimentados com ração hipercolesterolêmica (B) por 14 dias.....	88
Figura 7. Avaliação do ensaio mutagênico do óleo da polpa de macaúba e do azeite de oliva virgem extra em ratos <i>Wistar</i> machos. N14 - Animais alimentados com ração padrão por 14 dias; H14 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias; H14O7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias e suplementados com azeite de oliva virgem extra nos 7 dias finais; H14M7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias e suplementados com óleo da polpa de macaúba nos 7 dias finais. A barra representa o desvio padrão e a coluna a média. A análise estatística utilizada foi o teste de análise de variância (ANOVA) juntamente com o pós-teste de Bonferroni e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$	89
Figura 8. Avaliação do ensaio mutagênico do óleo da polpa de macaúba e azeite de oliva virgem extra em ratos <i>Wistar</i> machos. H7N7 – Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias; H7O7 – Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementados com azeite de oliva virgem extra nos 7 dias finais; H7M7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementados com óleo da polpa de macaúba nos 7 dias finais. A barra representa o desvio padrão e a coluna a média. O asterístico representa dados significativos. A análise estatística utilizada foi o teste de análise de variância (ANOVA) juntamente com o pós-teste de Bonferroni e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$	98

LISTA DE EQUAÇÕES

CAPÍTULO 2

	Páginas
Equação 1. Índice de iodo dos triglicerídeos.....	66
Equação 2. Índice de iodo dos ácidos graxos livres.....	66
Equação 3. Cálculo de carotenóides totais.....	67
Equação 4. Cálculo do índice de aterogenicidade.....	69
Equação 5. Cálculo do índice de trombogenicidade.....	69
Equação 6. Razão entre os ácidos graxos hipocolesterolêmicos e Hipercolesterolêmicos.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

kg - Quilograma
KJ - Quilojoule
g - Grama
A, D, E e K - Vitaminas lipossolúveis
OH - Hidroxila
C=O – Carboxila
C - Carbono
CIS - Configuração espacial de uma molécula
TRANS - Configuração espacial de uma molécula
LDL - Low density lipoprotein / Lipoproteína de baixa densidade
MUFAs - Ácidos Graxos Monoinsaturados
PUFAs - Ácidos Graxos Poliinsaturados
AGT - Ácidos graxos trans
AGMI – Ácidos Graxos Monoinsaturados
HDL - High density lipoprotein / Lipoproteínas de alta densidade
LA - Ácido linoléico
ALA - Ácido linolênico
EPA - Ácido eicosapentanóico
DHA - Ácido docosaexaenóico
TAGs ou TGs - Triacilglicerídeos
Kcal - Quilocalorias
HMG – CoA – Hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA
CoA - Coenzima A
NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
VLDL - Very low density lipoprotein / Lipoproteína de baixa densidade
IDL - Intermediary density lipoprotein / Lipoproteína de densidade intermediária
mL - mililitros
Apo A, B e C - Apoproteínas A, B e C
CAD / DAC - Doença arterial coronariana
LCAT - Lecitina colesterol aciltransferase
LLP - Lipase lipoproteica ou Lipase Pancreática
PA - Pressão arterial
Kcal - Quilocaloria
HAS - Hipertensão arterial sistêmica
AHA – American Heart Association/Associação Americana do Coração
NCEP – National Cholesterol Education Program/Programa Nacional de Educação do Colesterol
mEq - Mol equivalente
nm - Nanometro
ISSN - Número internacional normatizado para publicações seriadas/Internacional Standard Serial Number
TXB2 – Tromboxano B2

LTB4 – Leucotrieno B4
IL-6 – Interleucina-6
CPR ou PCR – Proteína C Reativa
% - Por cento / percentagem
K - Potássio
KOH - Hidróxido de potássio
OH – Hidróxido ou hidroxila
CO₂ – Dióxido de Carbono
I₂ . Iodo
ha – Hectare
dL - Decilitro
mg - Miligramas
µg – Microcrograma
µL - Microlitro
m - Metro
A. acuelata - Acrocomia acuelata
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa
UCDB - Universidade Católica Dom Bosco
min. – Mínimo
máx. – Maximo
MS – Mato Grosso do Sul
AOCS – American Oil Chemists' Society
SSOG – Stazione Sperimentale per Le Industrie degli Oli e dei Gassi
IDR – Ingestão Diária Recomendada
RE – Retinol Equivalente
FAO – Food and agriculture Organization of the United Nations
WHO- World Health Organization
UV - Ultravioleta
°C - Grau Celsius
cm - Centímetro
α - Alfa
β - Beta
δ - Delta
γ - Gama
Δ - Delta
ω – Ômega
μ - Micra
Σ -Somatório
pH - Medida de ácidos e bases

RESUMO

A macaúba, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., é uma palmeira nativa das florestas tropicais. É encontrada em quase todo o território brasileiro, em maior concentração nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. A polpa do fruto é rica em óleo, sendo o ácido oléico, o componente majoritário. Possui também elevados teores de carotenóides. O consumo de óleos ricos em ácido oléico e antioxidantes tem sido associado ao controle de dislipidemias, reduzindo o LDL-colesterol e aumentando o HDL-colesterol no organismo. No entanto, até o momento não há informações consistentes sobre os efeitos do óleo da polpa de macaúba no metabolismo animal. Desta maneira, o presente trabalho objetivou caracterizar e avaliar comparativamente óleo bruto de polpa de macaúba e o azeite de oliva virgem extra sobre parâmetros sanguíneos, massa corporal e mutagênese em ratos Wistar. O óleo de macaúba e oliva apresentaram em torno de 60% de ácido oléico. Diferenciaram-se, sobretudo, pela elevada concentração de carotenoides na macaúba e ausência no óleo de oliva. Apesar de não ter sido detectado um efeito estatisticamente significativo, o óleo de macaúba, assim como o de oliva, apresentou uma tendência em reduzir os parâmetros sanguíneos séricos deletérios ao metabolismo. Óleo da polpa de macaúba, quando administrado conjuntamente com a ração padrão após indução a hipercolesterolemia, levou a um menor ganho de peso. O período de avaliação deve ser expandido para avaliar se esta ação positiva do óleo de macaúba realmente se efetiva. Não foi observada ação mutagênica do óleo da polpa de macaúba.

Palavras-Chave: Carotenóides, ácido oléico, cromatografia em fase gasosa, hipercolesterolemia, qualidade nutricional, HDL-colesterol, LDL-colesterol e doenças ateroscleróticas

ABSTRACT

The macauba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd.ex Mart, is a native palm from tropical forests. It is found throughout the Brazilian territory in higher concentration in the states of Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso and Mato Grosso do Sul. The pulp of macaúba is rich in oil and the major component is oleic acid. It also has high levels of carotenoids. The consumption of oils rich in oleic acid and antioxidants has been associated with the control of dyslipidemia, reducing LDL- cholesterol and increasing HDL- cholesterol in the body. However there is no consistent information on the effects of macauba pulp oil in animal metabolism. Thus this study aimed to characterize and compare crude oil of macauba pulp and extra virgin olive oil on blood parameters, body weight and mutagenesis in Wistar rats. The macauba and olive oil showed about 60% oleic acid. It is differentiated by the high concentration of carotenoids in the macaúba and absence in olive oil. Although it has not been detected a statistically significant effect, macauba and olive oil had a tendency to reduce blood serum parameters deleterious of metabolism. The macauba pulp oil when administered with the standard diet after inducing hypercholesterolemia, led to a lower weight gain. The evaluation period should be expanded to assess the real effectiveness of the positive action of macauba oil. There was no mutagenic action of pulp oil of macauba.

Keywords: Carotenoids, oleic acid, gas chromatography, hypercholesterolemia, nutritional quality, HDL- cholesterol, LDL- cholesterol and atherosclerotic diseases

1. INTRODUÇÃO

A família Arecaceae, é constituída por um grupo de espécies conhecidas como palmeiras. No Brasil, existem 119 espécies e são distribuídas em 39 gêneros (Donatti, 2004). Dentre estas, encontra-se a macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex. Mart.) que está distribuída amplamente na América, incluindo México, Antilhas, Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai. É abundante e nativa no Estado de Mato Grosso do Sul. Possui inúmeros nomes populares, dependendo da região de distribuição. No Brasil é conhecida por macaúba, macacauba, macaiba, macaibeira, macajuba, macaúva, mucajá, bocaiúva, chiclete-de-baiano, coco-baboso, coco-de-espinho e outros (Moura *et al.*, 2009).

A polpa e a amêndoa são consumidas pela população na forma *in natura* ou nas preparações da culinária regional, tais como sorvetes, bolos, paçoca doce e cocada, podendo enriquecer a dieta como fonte complementar de nutrientes essenciais (Ramos *et al.*, 2008). Pode-se extrair óleo da polpa e da amêndoa. As características físico-químicas destes óleos são bastante distintas, possibilitando aplicações diversas.

O uso em larga escala de produtos e co-produtos da macaúba vem sendo estruturado em função da sua adaptabilidade a diferentes ambientes e alta densidade energética. Os frutos podem gerar de 1500 a 5000 kg de óleo por hectare/ano (Manfiol *et al.*, 2011) e o endocarpo fornece uma quantidade significativa de carvão vegetal de alta qualidade (Moura *et al.*, 2009). É ainda considerada uma espécie potencial para a produção de biodiesel (Teixeira, 2005), mas podem-se encontrar outras aplicações em função das características particulares dos óleos oriundos da amêndoa e polpa.

A elevada proporção de ácido oléico presente no óleo da polpa, próximo ao encontrado em azeite de oliva virgem extra, levanta a hipótese de ação biológica similar sobre o metabolismo lipídico alegado a esta tradicional oleaginosa.

O ácido oléico é um ácido graxo monoinsaturado que apresenta na sua composição 18 átomos de carbonos e apenas uma insaturação. Esta configuração molecular lhe confere características importantes. Reduz sensivelmente a síntese de lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol), que é a principal formadora da placa aterogênica nos vasos sanguíneos e, concomitantemente, aumenta os níveis

da lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), que transporta o colesterol livre dos tecidos e sangue para o fígado, para ser metabolizado e excretado pelo organismo (Fitó *et al.*, 2007; Granados-Principal *et al.*, 2010). Portanto, está associado a menor incidência de infarto ou acidente vascular cerebral ou periférico.

A dislipidemia está associada ao processo de aterosclerose. Uma alta concentração nos níveis de LDL-colesterol na corrente sanguínea e um nível baixo de HDL-colesterol aumentam o risco de doenças cardíacas. Os aumentos de LDL-colesterol associados com alguns fatores de risco como cigarro, hipertensão, histórico familiar, sedentarismo, diabetes, triglicérides alto, obesidade, uso de inibidores de proteases e o uso de drogas, determinam ser como sérios indicadores de risco cardiovascular (Laurenti *et al.*, 2000; Farmer *et al.*, 2011; S.B.C., 2007).

Por causa da sua composição, o azeite de oliva virgem extra ganhou muita atenção devido à sua benéfica implicação na saúde humana, reduzindo o risco de aterosclerose e desempenhando um papel protetor nas doenças cardiovasculares (Visoli e Gali, 2002).

Considerando o custo elevado do azeite de oliva virgem extra praticado no mercado brasileiro e a possível disponibilidade de uma alternativa da própria flora brasileira, uma importante estratégia é a inserção do óleo da polpa de macaúba como componente da dieta diária ou como suplemento alimentar.

Os fatores nutricionais são determinantes no aumento ou na diminuição da incidência de doenças cardiovasculares. A ingestão de maior proporção de ácidos graxos monoinsaturados e compostos antioxidantes (vitaminas e não-vitaminas) em substituição aos ácidos graxos saturados, podem reduzir esses fatores de risco e a susceptibilidade da parede vascular ao desencadimento de eventos pró-inflamatórios e pró-aterogênico (Carluccio *et al.*, 2007), sendo um ponto essencial para que estas doenças sejam prevenidas.

Até o momento não há informações consistentes sobre os efeitos do óleo da polpa de macaúba sobre o metabolismo lipídico. Este conhecimento é fundamental para se estabelecer diretrizes para a produção e consumo deste óleo. Visando agregar conhecimento nesta temática, o trabalho desenvolvido teve como objetivo avaliar o efeito do consumo do óleo da polpa de macaúba sobre dislipidemia induzida em ratos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Lipídeos

Os lipídeos podem ser definidos como um conjunto de substâncias orgânicas heterogêneas, que possuem alta solubilidade em solventes orgânicos como etanol, éter, benzeno e acetona e baixa solubilidade em água (Fuchs *et al.*, 2011).

Juntamente com as proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos, são componentes essenciais das estruturas biológicas e fazem parte de um grupo conhecido como biomoléculas (Monteiro *et al.*, 2000). Possuem inúmeras funções biológicas no organismo humano tais como, componentes estruturais de membranas celulares, reserva energética (Oresic, 2009; Brown, 2009), proteção contra choques mecânicos, precursores de alguns hormônios e isolante térmico (manutenção da temperatura do corpo) (Monteiro *et al.*, 2000).

Os lipídeos apresentam uma alta complexidade estrutural (Jänis *et al.*, 2008). Atuam como moléculas de sinalização, coordenando eventos bioquímicos entre as células. Incluem os eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos) em células de mamíferos (Shimizu, 2009), os estrogênios, que são hormônios circulantes (Hewitt, 2005), e os diacilgliceróis, que são importantes nos eventos intracelulares de transdução de sinal (Newton, 2009).

Estão distribuídos em todos os tecidos do organismo. Durante o controle homeostático do seu metabolismo, os lipídeos sofrem alterações moleculares, participando e desempenhando importante papel na patogênese de diversas doenças. Agem influenciando diretamente em muitos mecanismos dessas doenças por fazerem parte da estrutura das células dos órgãos alterados.

Dentre essas patologias incluem, o diabetes e a resistência à insulina (Medina-Gomez *et al.*, 2007; Oresic *et al.*, 2008), doença de Alzheimer (Hartmann *et al.*, 2007), esquizofrenia (Kaddurah-Daouk *et al.*, 2007; Schwarz *et al.*, 2008) e manifestações tóxicas de doenças infecciosas (Haughey *et al.*, 2008).

Os lipídeos são compostos de carbono, hidrogênio e oxigênio, porém em proporções diferentes das dos hidratos de carbono. São substâncias que vão desde a um simples ácido graxo à fosfolipídeos complexos, pigmentos solúveis em gordura, vitaminas e hormônios esteróides (Figura 1).

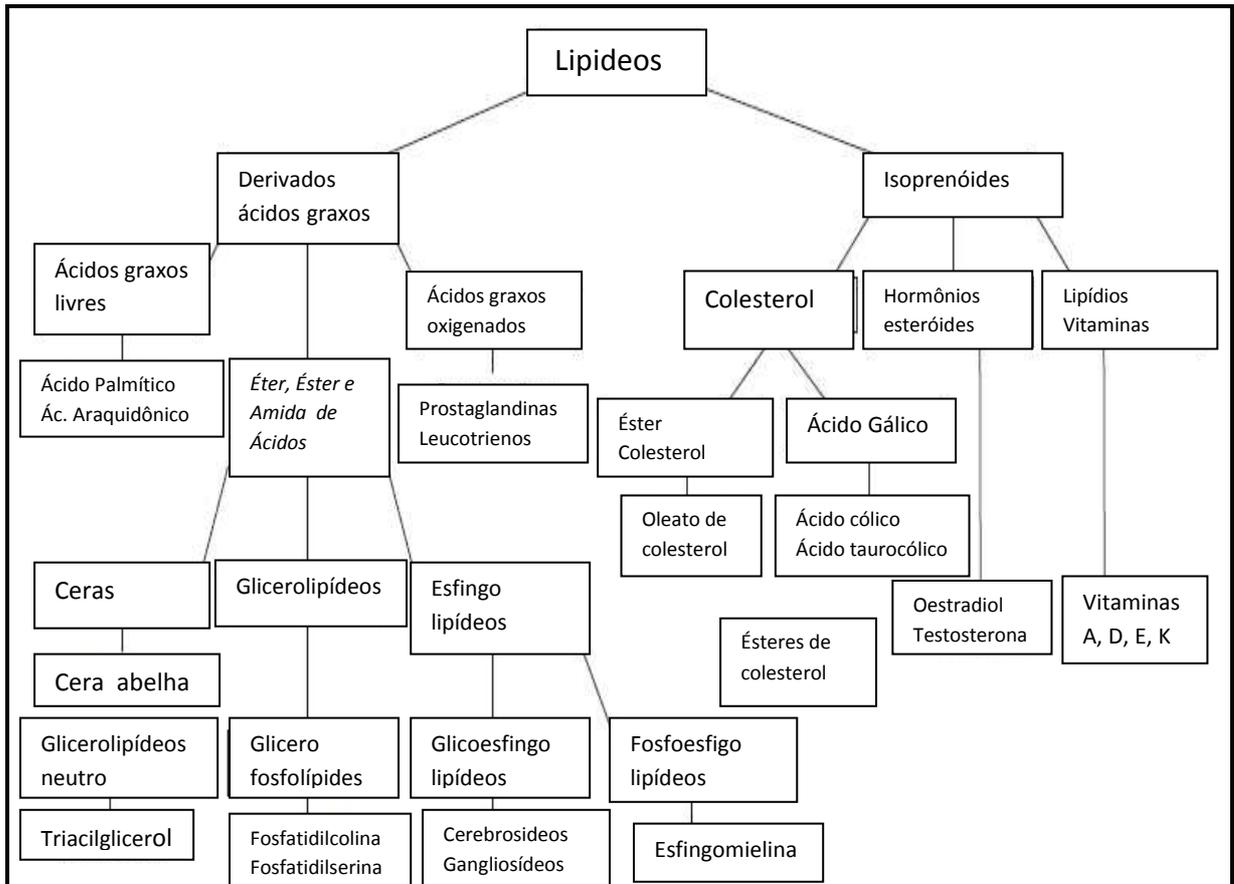


Figura 1. Breve levantamento das diferentes classes de lipídeos.
Fonte: Fuchs *et al.*, 2011.

Nos vegetais, os lipídeos têm como função reserva de energia. Os ácidos graxos contidos nos triglicerídeos que compõem a fração majoritária dos óleos vegetais, são moléculas orgânicas bem menores do que os carboidratos e possuem maior potencial de liberação de energia em sua oxidação do que os carboidratos ou seja, 38,9 kJ/g (lipídeos) e 17,2 kJ/g (carboidratos) (Motta, 2009). Os lipídeos ocorrem com maior frequência nas sementes, frutos e folhas. Uma grande variedade de espécies de plantas acumulam óleos nas sementes para disponibilizar energia durante a germinação (Somerville *et al.*, 2000). Existem outros compostos lipídicos importantes encontrados nas sementes como os fosfolipídeos, tocoferóis, glicolipídeos e esteróis (Mayer *et al.*, 1975).

Os lipídeos são classificados como simples e compostos. Os lipídios simples são compostos formados por álcool e ácido graxo e são representados pelos monoglicerídeos, diglicerídeos, triglicerídeos e os cerídeos. São os óleos, gorduras e as ceras (Claro, 2004; Harper, 2002).

Os monoglicerídeos são glicerídeos com uma das hidroxilas esterificadas com ácido graxo. Os diglicerídeos são glicerídeos com duas das hidroxilas esterificadas com ácido graxo. Diacilglicerol, diacil-3-fosfoglicerol são precursores importantes de fosfolípídeos de membrana (Claro, 2004). Os triglicerídeos são glicerídeos que possuem as três hidroxilas esterificadas com ácidos graxos. Nos animais são sintetizados no fígado e armazenados no tecido adiposo. Servem como isolante térmico e como principal forma de estoque de energia no organismo. São sintetizados a partir de Acil-CoA e glicerol-3-fosfato e, portanto a glicose é fundamental para a produção de triacilgliceróis.

Os óleos vegetais e as gorduras são triésteres de glicerol originados da condensação de uma molécula de glicerol com três moléculas de ácido graxo (Figura 2) (Dantas *et al.*, 2007; Vecchio *et al.*, 2008).

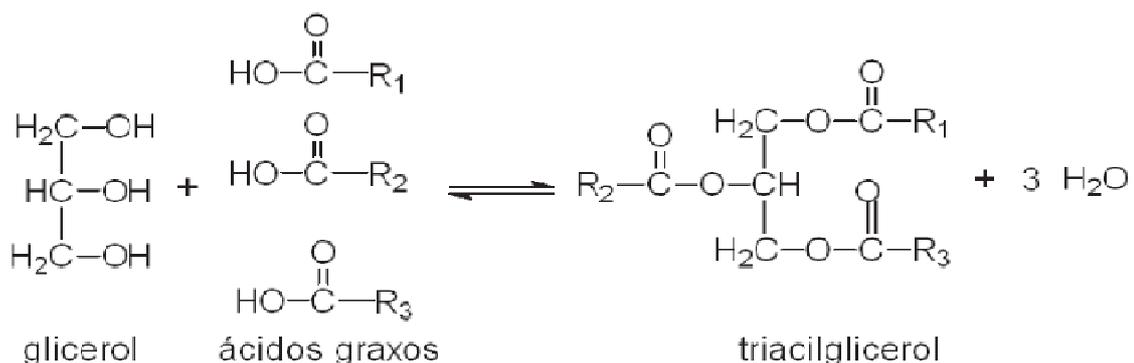


Figura 2. Formação de um triacilglicerol por reação de esterificação entre três moléculas de ácidos graxos e uma de glicerol.

Fonte: Adaptado de Schuchardt *et al.*, 1998.

As ceras ou cerídeos são ésteres derivados de ácidos graxos e alcoóis de cadeia longa com diferentes pesos moleculares. São mais duras e quebradiças e por isso servem de proteção nos vegetais (cera de carnaúba).

Os lipídeos compostos são formados por ésteres de glicerol, ácidos graxos e outras substâncias como hidratos de carbono, fosfatos ou compostos hidrogenados, através da ação de enzimas ou hidrólises (Chor *et al.*, 1999; Menotti *et al.*, 2000). Exemplo de lipídeos compostos são os fosfolípídeos e esfingolípídeos, lipoproteínas, ergosterol, glicolípídeos, prostaglandinas, carotenóides, vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), esteróides e o colesterol (O'keefe *et al.*, 1996; Gianini, 1998; Chor *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2008).

Os esteróides são compostos lipossolúveis de alto peso molecular. A

estrutura básica é formada por 17 átomos de carbono dispostos em quatro anéis ligados entre si. Os que contêm um ou mais grupos hidroxila (OH) e nenhum grupo carboxila (C=O), são chamados de esterol. O esterol mais abundante nos tecidos de animais é o colesterol. Está presente em lipoproteínas (proteínas transportadoras), hormônios (cortisol, testosterona, aldosterona etc), sais biliares, vitamina D, receptores, alcalóides (plantas), enzimas e membranas celulares, formando estruturas altamente organizadas. Todos os esteróides apresentam em comum a estrutura química denominada ciclo-pentano-peridro-fenantreno (Kuksis, 2005; Harper, 2002).

2.2 Ácidos Graxos

As unidades básicas formadoras dos lipídeos são os ácidos graxos, que se constituem por cadeias de hidrocarbonetos com 4 a 24 unidades de carbono (Tabela 1). São quase que inteiramente ácidos carboxílicos alifáticos de cadeia linear (Bruice, 2006).

Possuem um grupamento metil em uma das extremidades da cadeia carbônica e um grupamento carboxila do lado oposto (Figura 3). Em geral, não existem livres dentro das células em alta concentração e estão quase sempre combinados com glicerol (glicerol: poliálcool com 3 carbonos e 3 grupos hidroxila (Hood, 1987).

Dois números separados por dois pontos indicam, respectivamente, o comprimento da cadeia e do número de ligações duplas: ácido octadecenóico com 18 carbonos e uma ligação dupla é, portanto, 18:1 (ácido oléico). Os ácidos graxos insaturados possuem pontos de fusão menor do que os saturados (Bruice, 2006).

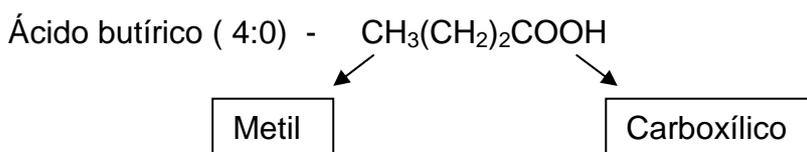


Figura 3. Ácido graxo com grupamento metil e carboxílico em lados opostos.

Tabela 1. Nomenclatura e propriedade física de ácidos graxos.

Símbolo	Nome comum	Fórmula estrutural	Temperatura de fusão (°C)
4:0	Butírico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	-7,9
6:0	Capróico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	-3,0
8:0	Caprílico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	17,2
10:0	Cáprico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	31,0
12:0	Láurico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	44,2
14:0	Mirístico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	52,0
16:0	Palmítico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	63,1
16:1	Palmitoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-0,5
18:0	Estearico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	69,1
18:1	Oléico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	13,2
18:2	Linoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-9,0
18:3	Linolênico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-17,0
20:0	Araquídico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	75,4
20:4	Araquidônico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	-49,5
22:0	Beênico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	81,0
24:0	Lignocérico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	84,2

* número de átomos de carbono: número de ligações duplas.

Fonte: Adaptado de Voet *et al.*, 2000.

Provavelmente, existem menos de 20 ácidos graxos que são importantes na dieta humana (Woodside *et al.*, 2008). Os ácidos graxos estão presentes em frutas, óleos vegetais, sementes, nozes, gorduras animais e óleos de peixe como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Características e fontes de ácidos graxos.

Nome	Nº átomos de carbono	Tipo de ácido graxo	Fontes comuns
Ácido Palmítico	16	Saturado	Óleo de palma
Ácido Estearico	18	Saturado	Gordura animal
Ácido Oléico	18	Monoinsaturado	Óleo de oliva
Ácido Linoléico	18	Poliinsaturado	Óleo de cártamo
Ácido Linolênico	18	Poliinsaturado	Óleo de soja
Ácido Araquidônico	20	Poliinsaturado	Carne, leite
Ácido icosapentanóico	20	Poliinsaturado	Óleo de peixe
Ácido Docosahexaenóico	22	Poliinsaturado	Óleo de peixe

Fonte: Adaptado de White, 2009.

Entre as categorias dos ácidos graxos estão: saturados, monoinsaturados, poliinsaturados e as gorduras cis e trans. Nas moléculas dos ácidos graxos saturados não existem duplas ligações em sua cadeia carbônica o que difere dos insaturados que possuem uma ou mais duplas ligações.

Os óleos são formados principalmente por ácidos graxos insaturados e as gorduras por ácidos graxos saturados (Moretto *et al.*, 1998). São exemplos de ácidos graxos saturados aterogênicos o ácido láurico (12:0), ácido mirístico (14:0), ácido palmítico (16:0) e a exceção o ácido esteárico (18:0) que não influencia na aterogenicidade (Schaefer, 2002).

Do ponto de vista nutricional, os óleos e as gorduras possuem importantes propriedades funcionais. São capazes de produzir efeitos metabólicos ou fisiológicos benéficos para a saúde humana. Dentre esses efeitos, estão a redução de doenças crônico-degenerativas, fornecimento de calorías para as atividades diárias, contribuem para a palatabilidade dos alimentos, funcionam como veículos para as vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e são fontes de ácidos graxos essenciais (ácido linoléico, linolênico e araquidônico (Castro *et al.*, 2004; Fuentes *et al.*, 2010).

A maioria das gorduras animais possuem ácidos graxos saturados e são encontrados em diversos produtos (carnes, produtos lácteos e banhas). O consumo excessivo de alimentos ricos em gorduras ou óleos contendo ácidos graxos saturados com cadeia variando entre 12 a 16 carbonos, podem aumentar os risco de doenças cardiovasculares. Essas gorduras e óleos com ácidos graxos saturados isolados ou em conjunto com o colesterol, promovem o aumento da LDL-colesterol, exercendo influência negativa e podendo estar associado na potencialização do desenvolvimento da aterosclerose (Ribeiro *et al.*, 2004).

Um grande número de ácidos graxos insaturados ocorre na natureza. A diferença básica entre eles está no comprimento da cadeia carbônica e no número e localização das insaturações. As gorduras insaturadas são divididas em monoinsaturadas (uma dupla ligação), os *monoinsaturated fatty acids* (MUFAs), e as poliinsaturadas (mais de uma dupla ligação), os *polyunsaturated fatty acids* (PUFAs) (Figura 4). A dupla ligação carbono-carbono encontrada em ácidos graxos mono ou poliinsaturados podem existir na configuração *cis* ou *trans*. Quando os dois átomos de hidrogênio estão em lados opostos da ligação dupla, a configuração é chamada *trans* e quando os átomos de hidrogênio estão do mesmo lado da ligação dupla, a

configuração é chamada *cis* (White, 2009; Nelson *et al.*, 2010).

Frequentemente a insaturação assume a configuração do tipo *cis* (Z). A configuração *cis* confere à cadeia do ácido graxo uma rigidez estrutural que influencia na sua organização molecular com a redução de suas forças intermoleculares atrativas. As ligações duplas *cis* são inseridas pela enzima dessaturase em posições específicas em relação ao grupo carboxila.

Os ácidos graxos de configuração *cis* exercem vários efeitos potencialmente antiaterogênicos, incluindo redução dos níveis plasmáticos de LDL-colesterol, aumento da vasodilatação e redução da agregação plaquetária (Ribeiro *et al.*, 2004).

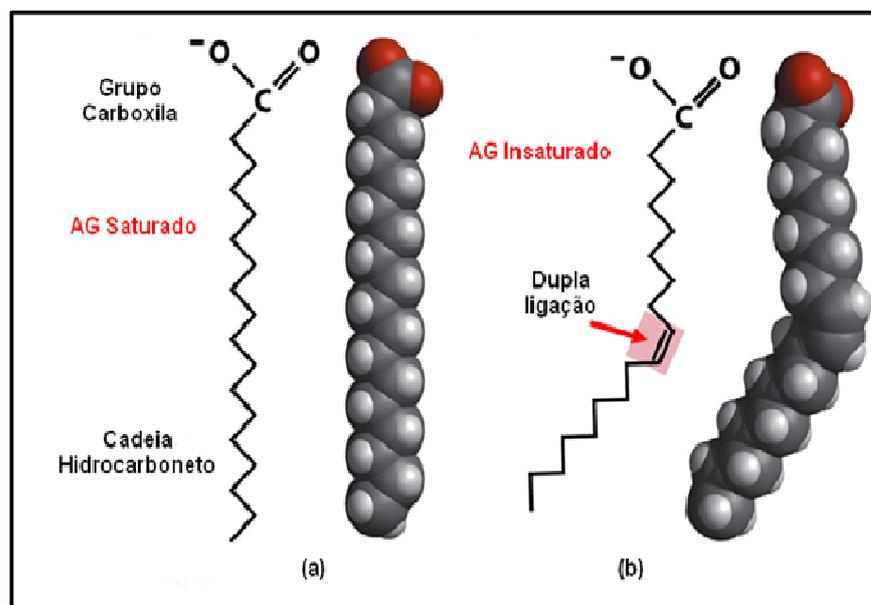


Figura 4. Representação esquemática de ácidos graxos saturado e insaturado; (a) ácido graxo saturado - ácido esteárico 18:0 e (b) ácido graxo insaturado - ácido oléico 18:1(Δ^9). Fonte: Nelson *et al.*, 2010.

Os animais têm capacidade limitada de adicionar insaturações nos ácidos graxos, comparados com as células vegetais e geralmente estão na configuração do tipo *cis*.

Enquanto a maioria dos óleos vegetais e de peixes contém grandes quantidades de ácidos graxos insaturados e poliinsaturados, o óleo de coco, o de dendê e o chocolate, embora sendo produtos vegetais, contém maiores quantidades de ácidos graxos saturados (Menotti *et al.*, 2000).

As gorduras *trans* (AGT) são ácidos graxos insaturados com pelo menos uma ligação dupla na configuração *trans* (Mozaffarian *et al.*, 2009; Dorfman *et al.*, 2009). Estão presentes em pequenas quantidades naturalmente em produtos lácteos e

carne, mas em grandes quantidades em algumas margarinas e gorduras de cozinha.

A transesterificação é o termo geral usado para descrever uma importante classe de reações orgânicas na qual um éster é transformado em outro através da troca de grupos alcóxidos (Urioste, 2004). Na transesterificação de óleos vegetais, um triglicerídeo reage com um álcool na presença de um catalizador produzindo uma mistura de ésteres monoalquílicos de ácidos graxos e glicerol. Os ésteres monoalquílicos podem ser utilizados na produção de lubrificantes, polímeros, plastificantes papéis, tecidos e alimentos (Gibbons et al., 1997; Arcos et al., 1998; Youssef et al., 2001). São métodos industriais onde ocorre a hidrogenação de gorduras vegetais (Erkkilä et al., 2008). A hidrogenação converte de 30-60% de ligações insaturadas do tipo *cis* para o *trans*. Os ácidos graxos *trans* (AGT) são raros na dieta humana natural. O alto conteúdo de AGT fornece propriedades físicas e químicas atraentes para os fabricantes de alimentos, incluindo serem de relativo baixo custo e diminuírem a rancificação aumentando a vida útil do alimento (Mozaffarian et al., 2010).

Porém, recomenda-se o consumo de baixa quantidade de AGT. A indústria de alimentos vem trabalhando de diversas maneiras para eliminar ou reduzir significativamente os AGT dos produtos alimentares. Concentram-se esforços e tecnologia na modificação do processo de hidrogenação, no uso de interesterificação e no uso de altas frações de sólidos a partir de óleos naturais (Hunter et al., 2006).

Os desafios da indústria em substituir AGT nos alimentos são para desenvolver e formular opções que ofereçam funcionalidade equivalente e economicamente viável aos óleos, e não aumentar o teor de ácidos graxos saturados (Hunter et al., 2010).

No organismo humano, os ácidos graxos *trans* podem tornar-se extremamente tóxicos. Os isômeros *trans* reduzem os níveis de HDL-colesterol, aumentam a LDL-colesterol e o colesterol total (lipídios simples, lipídios complexos, lipídios precursores e derivados) (Menotti et al., 2000).

Por esse motivo, muitas indústrias não estão mais utilizando esses compostos em suas formulações. Uma alternativa é o uso de gorduras saturadas ricas em ácido láurico (C 12:0), tais como gorduras vegetais de origem tropical, que resultam em um perfil lipídico sanguíneo mais favorável do que uma gordura sólida rica em ácidos graxos *trans* (Roos et al., 2001). O interesse em obter óleos de frutos e sementes de

plantas com determinado perfil de ácidos graxos pela biotecnologia é de grande interesse pelas necessidades nutricionais e industriais (Somerville *et al.*, 2000).

2.3 Ácidos Graxos Essenciais

Nos países ocidentais, a ingestão de gordura deve estar na faixa de 25-35% do total de calorias diárias, com a maioria das gorduras provenientes de fontes dotadas de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados (MUFAs e PUFAs, respectivamente).

O ácido linoléico (LA, 18:2 n-6) e o ácido linolênico (ALA, 18:3 n-3) são membros de duas classes de PUFAs, conhecidos como ômega-6 e ômega-3. Do ponto de vista bioquímico, ambos têm 18 átomos de carbonos em sua cadeia acil apresentando duas ligações duplas (LA) ou três ligações duplas (ALA) (Russo, 2009) conforme demonstrado na Figura 5.

Do ponto de vista nutricional, o LA e o ALA são comumente considerados como ácidos graxos essenciais, uma vez que não são sintetizados pelo corpo humano sendo obtidos na dieta e imprescindíveis para o nosso organismo. A carência dos ácidos graxos essenciais pode causar a perda de peso e eczema (Menotti *et al.*, 2000).

As plantas são capazes de adicionar uma insaturação no carbono Δ^{12} , produzindo ácido linoléico, e Δ^{15} , produzindo o ácido α -linolênico. Os seres humanos sintetizam a partir do ácido linoléico (ômega-6) e α -linolênico (ômega-3) uma série de outros ácidos graxos mais longos e mais insaturados (Wallis *et al.*, 2002; Das, 2006).

As fontes de alimentos contendo ácidos graxos ômega-6 são as gorduras animais e os óleos vegetais líquidos como o de soja, milho, girassol, óleo de cártamo, óleo de sementes de algodão, amendoim.

Porém, ácidos graxos do tipo eicosapentanóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA) (ômega 3) são abundantes em peixes e algumas sementes como as nozes e óleos de linhaça e canola e o consumo desses ácidos graxos parecem ter efeitos benéficos, como a redução de incidência de acidentes vasculares e melhora na memória (Wallis *et al.*, 2002; Das, 2006).

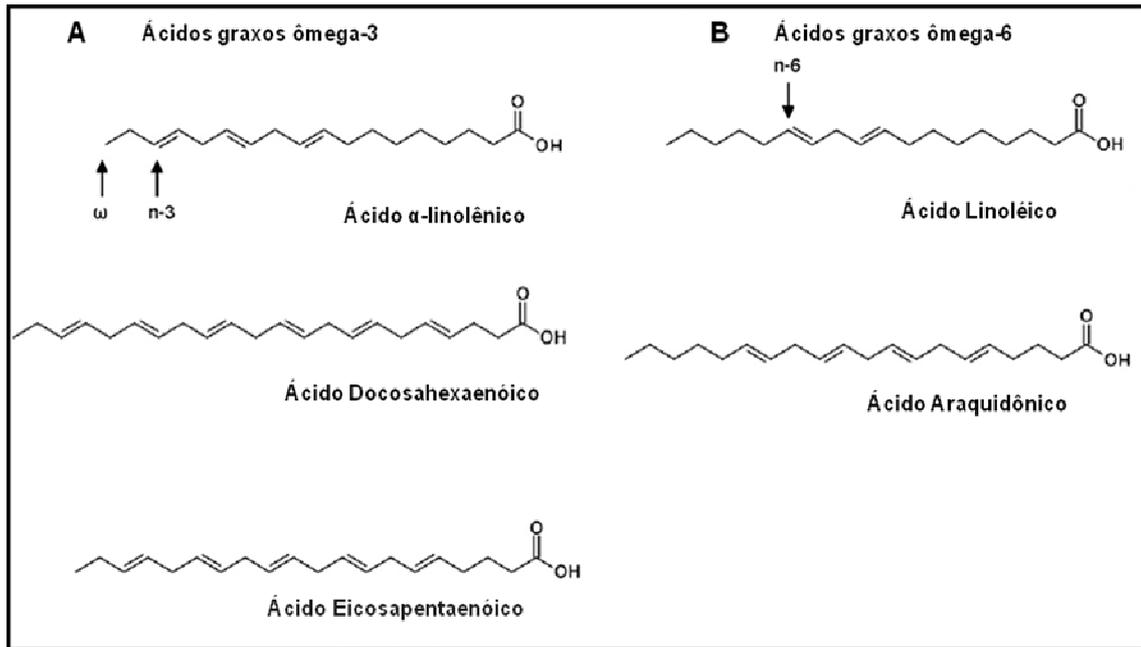


Figura 5. Representação esquemática dos ácidos graxos poliinsaturados essenciais - ômega-3 e ômega-6. Fonte: Kishan *et al.*, 2011.

A partir do LA e ALA é possível sintetizar o ácido araquidônico (20:4 n-6), di-homo-gamalinoléico (20:3 n-6), e eicosapentaenóico (20:5 n-3) que são precursores dos prostanóides e dos leucotrienos (Menotti, *et al.*, 2000), representados na Figura 6. Os prostanóides são obtidos pela enzima cicloxigenase, que converte esses ácidos graxos livres em endoperóxidos cíclicos, originando as prostaglandinas e tromboxanos. Os leucotrienos são obtidos pela ação da enzima lipoxigenase, que também está relacionada com a produção das lipoxinas. Para a alongação dos LA e ALA estão presentes as enzimas alongases e dessaturase, que podem ter sua atividade diminuída pela ação de fatores como tabagismo, consumo de álcool, diabetes, estresse, ingestão elevada de gorduras *trans*, e, principalmente, pelo envelhecimento (Martin *et al.*, 2006). As enzimas alongases atuam adicionando dois átomos de carbono à parte inicial da cadeia, e as dessaturases agem oxidando dois carbonos da cadeia, originando uma dupla ligação com a configuração *cis*.

No reino vegetal é muito comum a síntese do ácido linoléico, ocorrendo também a sua conversão em alfa-linolênico (Menotti *et al.*, 2000).

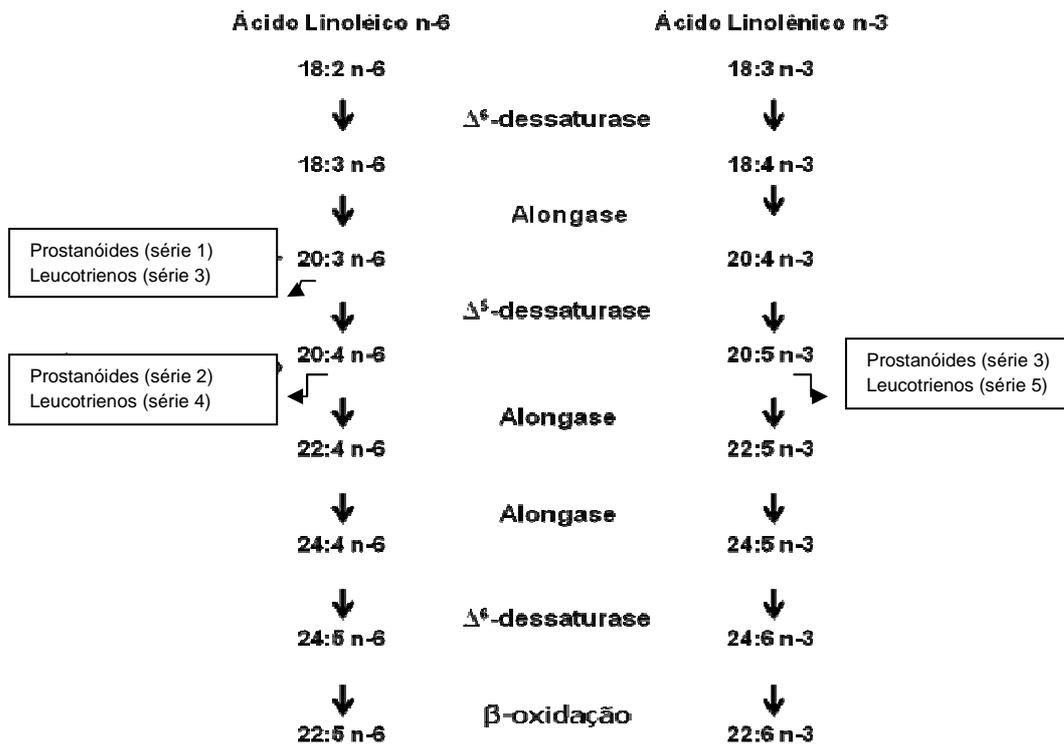


Figura 6. Metabolismo dos ácidos graxos das famílias ômega-6 e ômega-3.
Fonte: Adaptado de Martin *et al.*, 2006 e Innis, 2003.

Os ácidos graxos de cadeia muito longa, como os ácidos araquidônico e docosahexaenóico, desempenham importantes funções no desenvolvimento e funcionamento do cérebro e da retina. O ácido araquidônico é o ácido graxo de cadeia longa mais abundante na membrana plasmática (Martin *et al.*, 2006).

2.4 Triacilglicerídeos

Os triacilglicerídeos (TAGs) são moléculas formadas de três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol através de ligações ésteres. Os ácidos graxos utilizados para a formação de TAGs hepático são derivados de três fontes: (i) da dieta, (ii) da síntese de novo, e (iii) do tecido adiposo (Ferstl *et al.*, 2010).

Os TAGs emergiram como nutriente de armazenamento de energia. A seleção do TAGs para este papel é atribuída a duas propriedades físico-químicas: os TAGs fornecem maior densidade calórica (9 kcal/g) do que os carboidratos (4,5 kcal/g) ou proteínas (4 kcal/g). Os TAGs são insolúveis em água, podendo acumular em níveis elevados sobre as células. Em organismos superiores, os TAGs são estocados nos adipócitos, e acumulada em outros tipos celulares apenas em

circunstâncias incomuns (Cohen *et al.*, 2011).

2.5 Colesterol

Outra classe pertencente aos lipídeos é a que inclui o colesterol. É um esteróide constituído de quatro anéis hidrocarbonados ligados, como demonstrado na Figura 7 (Stryer *et al.*, 2008).

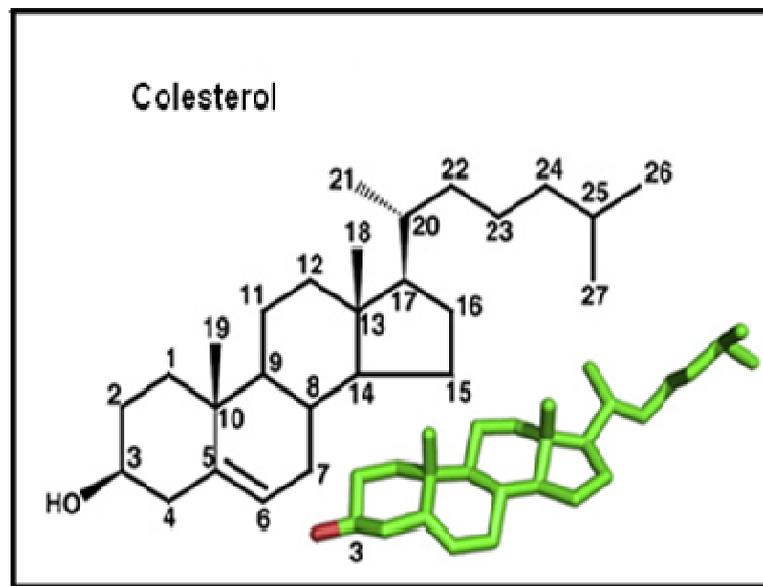


Figura 7. Modelo estrutural da molécula de colesterol.
Fonte: Kwon *et al.*, 2009.

Essa molécula desempenha inúmeras funções nas células animais como: componente estrutural das membranas celulares; substrato para a síntese de hormônios esteróides, ácidos biliares, vitamina D e coenzima Q; regulador da transcrição do gene, na degradação de proteínas e na atividade das enzimas (Figura 8). O colesterol também tem sido implicado na morte celular programada e transdução de sinal (Pikuleva, 2006; Pucadyil *et al.*, 2006; Gimpl *et al.*, 2011).

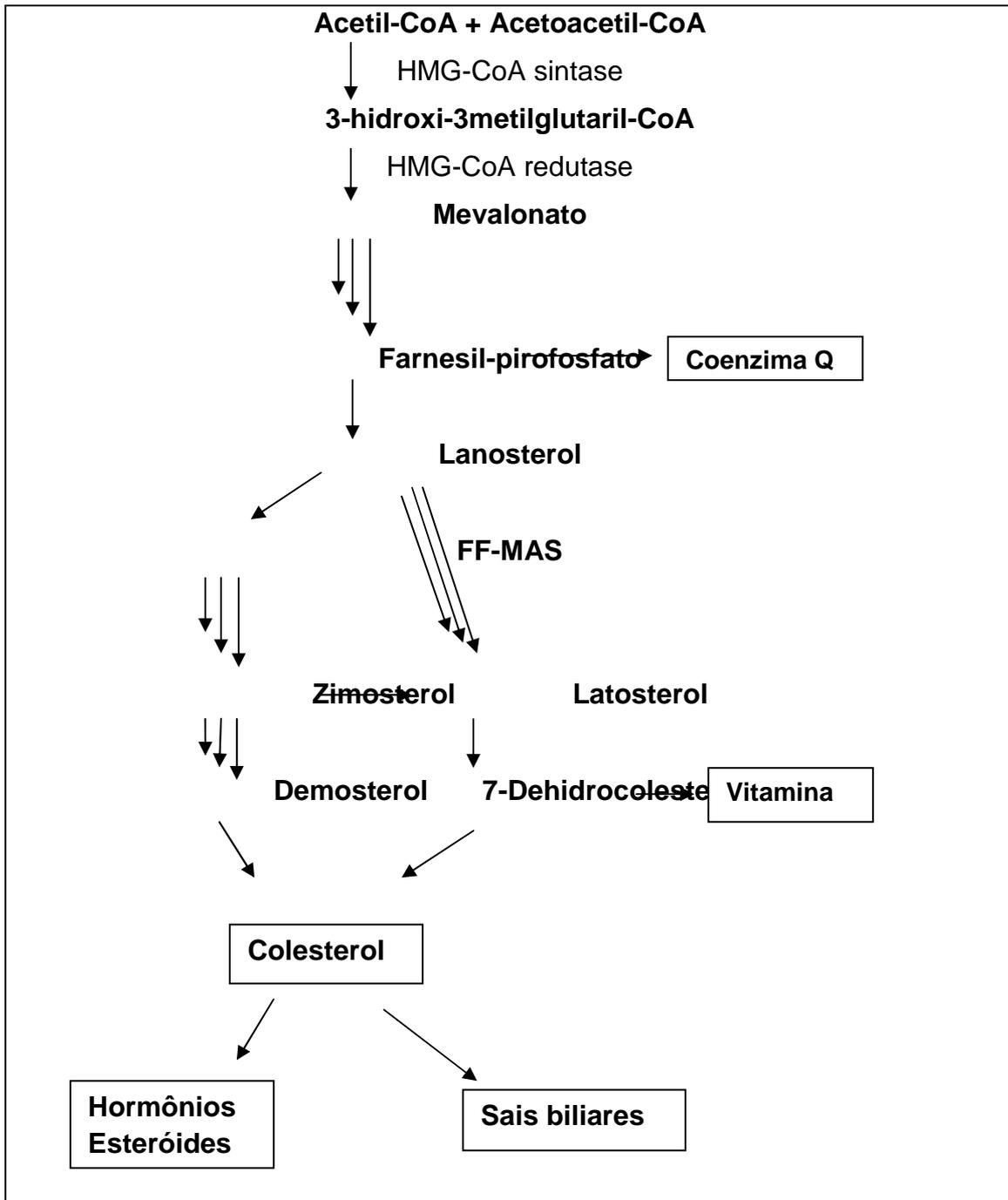


Figura 8. Papel central do colesterol na produção compostos fisiologicamente ativos. Fonte: Rezen *et al.*, 2011.

Estima-se que em humanos 300-500mg de colesterol é adquirido diariamente na dieta, e 600-900mg é sintetizado como novo colesterol a partir da acetil-coenzima A (acetil-CoA). Com a média diária de 1200mg de colesterol, acaba destinando-se 400-600mg utilizada e degradada em ácidos biliares, 600mg é secretado na bile, 85mg é perdido por descamação de células e 50mg é utilizado para a biossíntese de hormônios esteróides (Repa *et al.*, 2000).

O fígado e o intestino delgado são os principais órgãos produtores de

colesterol. A sua homeostase é um processo onde nível de colesterol é estreitamente regulado. Para alcançá-la o organismo deve integrar a síntese do novo colesterol, com a sua captação na circulação medida por receptores. Essa captação engloba inúmeros mecanismos como: deposição de colesterol nas membranas; secreção através das lipoproteínas; armazenamento intracelular de ésteres de colesterol; metabolismo de ácidos biliares e hormônios esteróides (Rezen *et al.*, 2011). O Acetil CoA é o precursor de todos os carbonos do colesterol e o NADPH o agente redutor.

O colesterol é o esteróide mais abundante encontrado em gorduras animais. As plantas não o possuem. Está presente em grande quantidade no cérebro, tecido adiposo e membranas celulares. Cerca da metade do colesterol está nas membranas biológicas, entre os fosfolipídeos, ajudando a manter a fluidez (Menotti *et al.*, 2000).

2.6 Lipoproteínas

Lipoproteínas são um grupo diverso de partículas esféricas ou discóide composto basicamente de colesterol, triglicerídeos, fosfolipídeos e apoproteínas (Sparks *et al.*, 2008). Elas são tradicionalmente separadas em categorias com base na densidade apoprotéica (Tabela 3).

Tabela 3. Definição das lipoproteínas com base nas faixas de densidade das apoproteínas.

Lipoproteínas	Densidade g/mL
Quilomícrons	<0.94
VLDL	0.94-1.006
LDL	1.006 -1.063
IDL	1.006-1.020
LDL2	1.020-1.063
HDL	1.063-1.200
HDL2	1.063-1.125
HDL3	1.125-1.200
(HDL1)	Perto de 1.060

Fonte: Adaptado de Superko, 2009.

As categorias tradicionais incluem as ricas em triacilgliceróis, que são as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL-colesterol) e as lipoproteínas de densidade intermediária (IDL-colesterol), e as relativamente ricas em colesterol sendo a lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) e a lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) (Superko, 2009).

Os fosfolípidos presentes nas lipoproteínas são importantes para manter a integridade das membranas celulares e a solubilidade dos ésteres de colesterol e dos triglicerídeos no interior das lipoproteínas (Menotti *et al.*, 2000). As apoproteínas são proteínas associadas a uma partícula de lipoproteína e recebem nomes em ordem alfabética, como apoproteína A, B, C, D, e E. Projetam-se na superfície das lipoproteínas, e são reconhecidas por receptores. A apoproteína A (apoA), possui diversas formas, incluindo apoA-I e apoA-II, sendo responsável por 70% das apoproteínas presentes na partícula de HDL-colesterol (Superko, 2009; Brewer, 2011). A apoproteína B (apoB) atua como proteína específica para identificação de receptores localizados em células hepáticas e teciduais envolvidas com o metabolismo das LDL-colesterol.

A apoB-100, esta envolvida na formação das VLDL-colesterol (Niu *et al.*, 2011). A apoproteína C (apoC), juntamente com apoA-I, é um ativador da enzima lecitina-colesterol aciltransferase presente na partícula de HDL-colesterol (Superko, 2009). A diferença básica entre cada lipoproteína está na quantidade de lipídeos e de proteínas presentes na molécula. Será mais densa a lipoproteína que possuir maior concentração de proteínas em sua composição. As funções básicas das lipoproteínas são: transporte de triglicerídeos do intestino e fígado para os tecidos periféricos (ácidos graxos armazenados e os da dieta); transporte de colesterol e fosfolípidos para os tecidos periféricos e fígado e o inverso; transporte de vitaminas lipossolúveis; transporte de enzimas antioxidantes; neutralização de endotoxinas; efeito de lipídeos oxidados nas defesas imunológicas e de inflamações (Carpentier *et al.*, 2006).

O metabolismo das lipoproteínas e o transporte de lipídeos estão ilustrados na Figura 9.

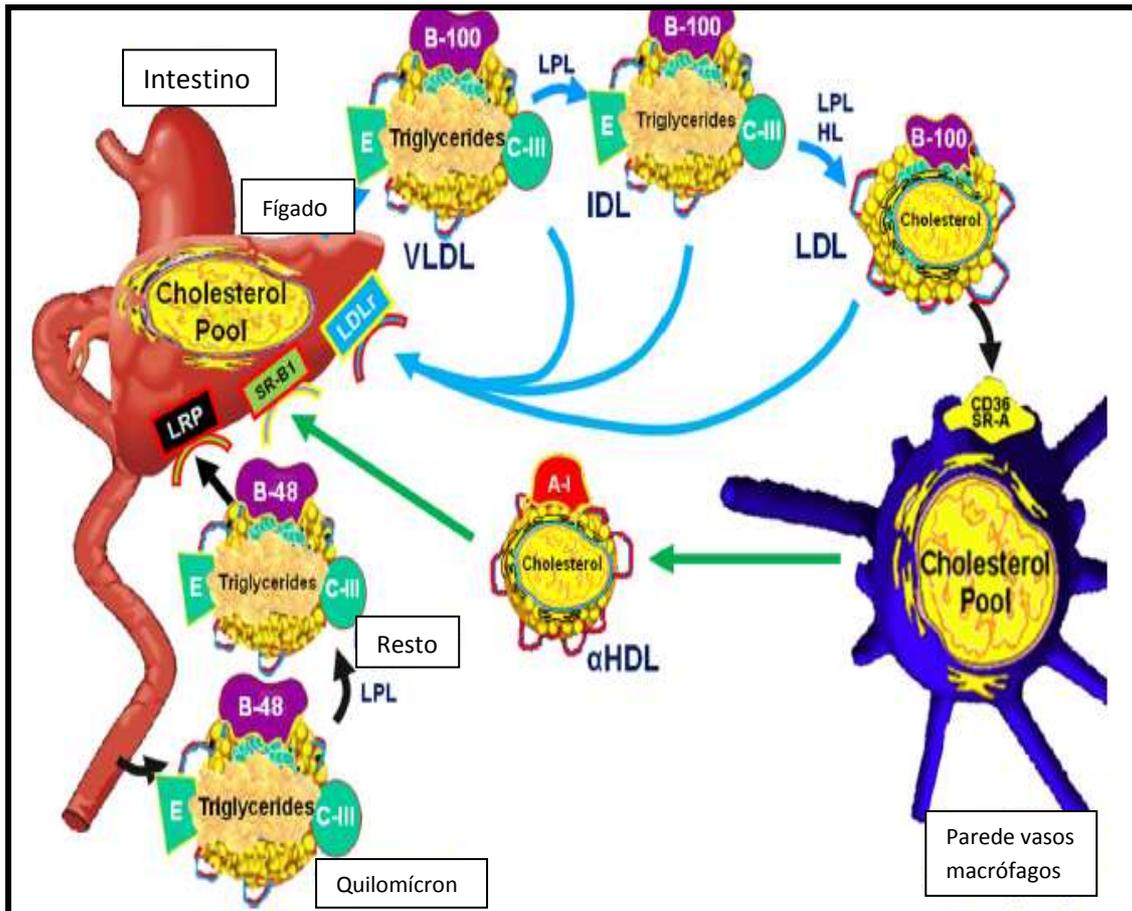


Figura 9. Visão esquemática do metabolismo das lipoproteínas e o transporte de lipídeos. Fonte: Brewer *et al.*, 2011.

2.6.1 Lipoproteína de Muito Baixa Densidade – VLDL

A VLDL é a principal lipoproteína produzida pelo fígado. São constituídas por 50% de triglicerídeos, 40% de colesterol e fosfolipídeos e 10% de proteínas, principalmente a Apo B-100, Apo C e Apo E.

Têm como função o transporte dos triglicerídeos e colesterol produzidos pelas células hepáticas. É considerado como um veículo de transporte responsável pela redistribuição de lipídeos endógenos do fígado para os tecidos periféricos (Blasiolo *et al.*, 2007). A principal função da secreção de VLDL hepática é servir como um “tampão” para os níveis de ácidos graxos no plasma sanguíneo. A consequência desta conversão é que a energia contida nas moléculas de ácidos graxos é armazenado e transportado em uma forma (não tóxica). Isto é de especial importância para o coração visto que, os lipídeos são os principais substratos energéticos para o órgão (Niu *et al.*, 2011).

2.6.2 Lipoproteína de Baixa Densidade – LDL

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) não são uma categoria homogênea de lipoproteínas, mas consistem de um conjunto de subespécies (I, IIa, IIb, IIIa, IIIb, IVa, IVb), com propriedades moleculares distintas, incluindo o tamanho e a densidade (Superko, 2009). São derivadas da conversão das VLDLs secretadas pelo fígado. As LDLs possuem densidade que variam entre 1.006-1.063 g/mL (gramas por mililitros), constituindo-se de um núcleo hidrofóbico, consistindo de triglicerídeos (10%) e ésteres de colesterol (37%), fechados em uma monocamada de fosfolipídeos (20%) e uma fração protéica (23%) (Nelson *et al.*, 2010), como demonstra a Figura 10. Nesta monocamada de fosfolipídeos estão o colesterol e as apoproteínas, que contribuem fortemente para a integridade estrutural, bem como as propriedades biológicas da lipoproteína (Skajaa *et al.*, 2010).

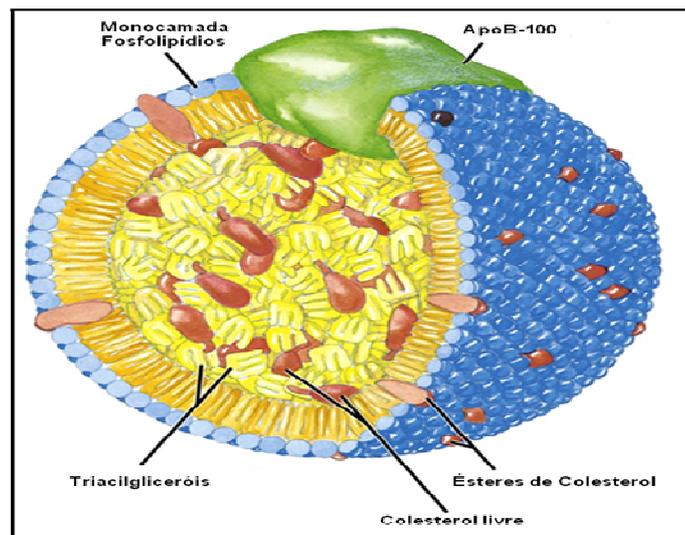


Figura 10. Estrutura da lipoproteína de baixa densidade (LDL). A apolipoproteína B-100 (apoB-100) é uma das maiores cadeias polipeptídicas conhecida, com 4.636 resíduos de aminoácidos (Mr 513.000). Uma partícula de LDL contém um núcleo com 1.500 moléculas de ésteres de colesterol, rodeado por cerca de 500 moléculas de colesterol, 800 moléculas de fosfolipídeos, e uma molécula de apoB-100. Fonte: Nelson *et al.*, 2010.

A lipoproteína LDL exporta o colesterol do fígado para os tecidos periféricos e órgãos. As células necessitam de uma fonte própria de colesterol para ser usada na manutenção das membranas plasmáticas. O aumento de LDL associado com alguns fatores de risco como cigarro, hipertensão, stress, histórico familiar, sedentarismo, diabetes, triglicérides alto, obesidade, uso de inibidores de proteases e o uso de

drogas, torna-se um dos mais poderosos predispositores de morte por doença cardiovascular (aterosclerose) (Laurenti et al., 2000). O aumento das concentrações na corrente sanguínea de LDL e a morte por doença arterial coronariana (DAC) está intimamente relacionada ao risco cardiovascular. Da mesma forma, existe uma relação linear entre a LDL e a redução na atenuação do risco de morte por DAC. Cada 1% de redução nos níveis de LDL no plasma reduz em 1% de diminuição na mortalidade por DAC. A LDL também é influenciada pelo fator hereditário, sendo que, 50% está relacionado com a predisposição familiar para doença arterial coronariana, mesmo em jovens aparentemente saudáveis (Tomaszewski *et al.*, 2009). Uma vida saudável, protegendo da aterosclerose, relaciona-se com a diminuição dos níveis na concentração de LDL no plasma (Eckel, 2010).

2.6.3 Lipoproteína de Alta Densidade – HDL

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) pertencem a uma classe heterogênea de lipoproteínas caracterizadas por um pequeno diâmetro variando entre 5 e 17 nm (nanômetros). É produzida no fígado e intestino (Skajaa *et al.*, 2010). Estas partículas contêm uma variedade de proteínas e enzimas, como a apoA-I que é o principal componente protéico. Estão presentes também a apoA-II, apoC-II, apoC-III e apoE. Os componentes enzimáticos da HDL incluem: lecitina colesterol-aciltransferase (LCAT), e o fator ativador de plaquetas (Farmer *et al.*, 2011). A montagem da lipoproteína inclui as proteínas anfipáticas (55%) que estabilizam emulsões lipídicas, uma monocamada de fosfolipídios (24%), colesterol livre (2%), um núcleo de triglicérides (4%) e ésteres de colesterol (15%). A densidade varia entre 1.063-1.210 g/mL (Nelson *et al.*, 2010). O papel antiaterogênico da lipoproteína HDL tem sido atribuído a uma série de propriedades como: ações anti-inflamatórias (Barter *et al.*, 2004; Gordon *et al.*, 2011); antitrombóticas (Mineo *et al.*, 2006); vasodilatadora; proteção contra a oxidação da LDL na parede arterial, evento considerado chave na aterogênese, conforme mostra a Figura 11. Outro importante mecanismo antiaterogênico da HDL é estar relacionado com o transporte reverso de colesterol, removendo-o dos tecidos periféricos e transportando-o para o fígado (Leança, *et al.*, 2010).

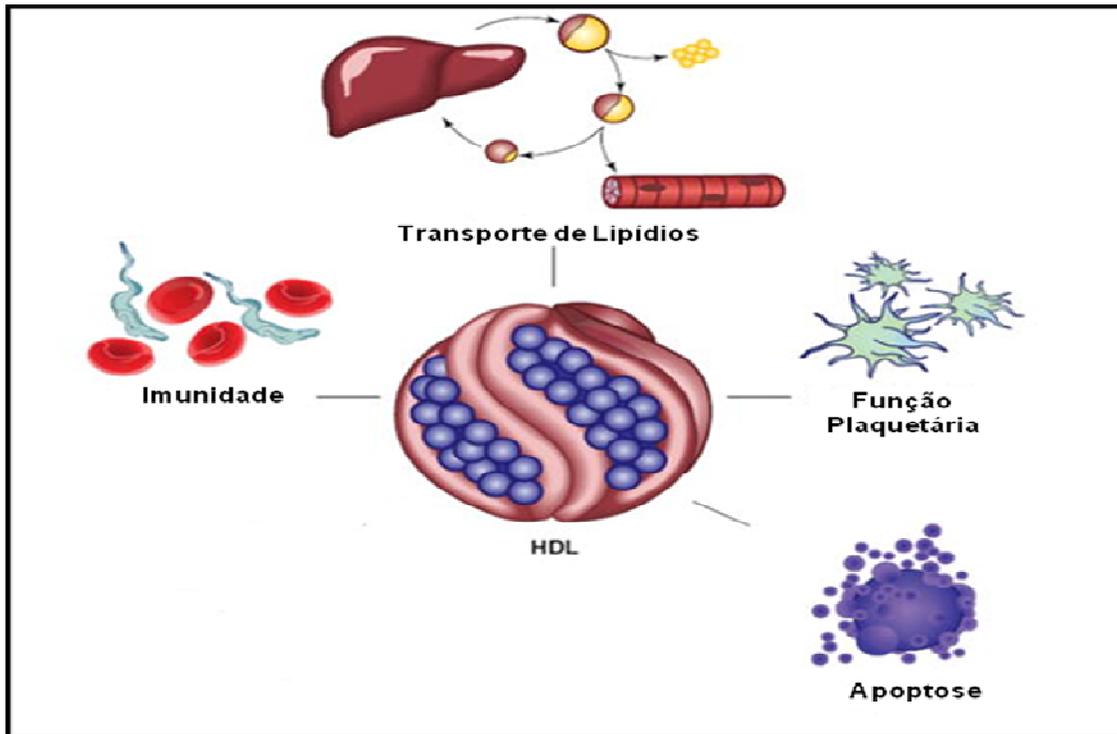


Figura 11. A heterogeneidade funcional da lipoproteína de alta densidade. Estudos recentes demonstram a variedade de funções da HDL, que era conhecida somente por seu papel no transporte de lipídeos. Fonte: Gordon *et al.*, 2011.

2.7 Aspectos Metabólicos dos Lipídeos

Os principais lipídeos para o ser humano são: ácidos graxos, colesterol, triglicerídeos e fosfolipídeos. Estas moléculas após os mecanismos de metabolização irão compor a porção lipídica das lipoproteínas (partículas transportadoras dos lipídeos no plasma sanguíneo). A outra parte das lipoproteínas é constituída por proteínas especiais, denominadas apolipoproteínas ou apoproteínas (apo). Esses lipídeos são originários de fontes exógenas (alimentação) e endógenas (síntese interna) (Hood, 1987).

2.7.1 Ciclo Exógeno

A gordura e os triglicerídeos provenientes da alimentação, são hidrolisados pela Lipase Lipoprotéica ou Lipase Pancreática (LLP) a diacilglicerídeos e a monoacilglicerídeos que, junto com os ácidos graxos e os sais biliares, formam as micelas que permitem o transporte dos lipídeos através da parede intestinal. Nestas, os monoacilglicerídeos são reesterificados a triacilglicerídeos que se unindo a uma

porção protéica (apoproteína) irão formar os quilomícrons. Estes circularão no sangue e nos capilares dos tecidos gordurosos ou musculares e serão metabolizados novamente pela LLP. Serão retirados os ácidos graxos e hidrolisados a triacilglicerídeos de menor tamanho que serão rapidamente removidos da circulação sanguínea pelo fígado (Hood, 1987).

2.7.2 Ciclo Endógeno

O ciclo endógeno tem início com a formação da VLDL (Very Low Density Lipoprotein) pelo fígado. A VLDL é constituída principalmente de triacilglicerídeos. No capilar sanguíneo eles entram em contato com a enzima Lipase Lipoprotéica ou Lipase Pancreática (LLP), são hidrolisados e absorvidos pelo fígado ou sofrem ação da Lipase Hepática dando origem à LDL (Low Density Lipoprotein). As LDLs são retiradas da circulação pelos hepatócitos e são fragmentadas liberando colesterol livre e aminoácidos na circulação. A única maneira que o organismo dispõe para eliminar o colesterol é através da bile como colesterol livre ou como ácido biliar (Hood, 1987).

Parte do material liberado pela ação da LLP sobre os quilomícrons e as VLDLs é utilizada na fabricação de outra lipoproteína, a HDL (High Density Lipoprotein) que é sintetizada no intestino e no fígado. A HDL é responsável pelo chamado transporte reverso do colesterol. Esse transporte retira o colesterol das células e troca-o com outras lipoproteínas (principalmente as VLDL) ou leva-o diretamente para o fígado para serem metabolizados (Hood, 1987). Há uma estreita relação benéfica entre as lipoproteínas HDL e as doenças cardíacas.

Quanto maior a concentração de HDL (acima de 40 mg/dl) na corrente sanguínea, menor a incidência de doenças cardíacas e aterosclerose. A lipoproteína HDL parece não ser afetada pela dieta ou a idade, ao contrário da lipoproteína LDL que esta diretamente relacionada com a dieta e com a idade (Hood, 1987).

2.8 Metabolismo das Lipoproteínas

Os quilomícrons provenientes da digestão dos alimentos são absorvidos pelo ducto linfático abdominal e são lançados na corrente sanguínea. Eles recebem a apo-C2 e apo-E da lipoproteína HDL que são transportados aos adipócitos. Neles são depositados os ácidos graxos dos triacilglicerídeos.

Após essa deposição dos ácidos graxos nos adipócitos, os quilomícrons tornam-se quilomícrons remanescentes e são captados pelos hepatócitos para a degradação do colesterol presente em sua molécula até a excreção na bile.

Os triacilglicerídeos e o colesterol endógeno são transportados pela VLDL sintetizada no fígado que recebe a apo-C2 e apo-E da HDL, depositando os triacilglicerídeos nos adipócitos. A VLDL remanescente (IDL) tem dois destinos: ou é captada pelos hepatócitos sendo excretado pela bile, ou doa a apo-C2 e apo-E para a HDL, recebendo colesterol esterificado, tornando-se LDL.

A lipoproteína LDL é captada por células periféricas (principalmente das gônadas e supra-renais) através de receptores específicos para apo-B100, podendo ser captada pelos hepatócitos. O fígado sintetiza HDL que retira colesterol livre do plasma e o esterifica com acilglicerol. Atua no metabolismo da VLDL e LDL onde ambas são captadas pelo fígado para a degradação do colesterol. Todo colesterol livre é transportado no sangue sob a forma de LDL.

Parte deste colesterol é captado pelos hepatócitos e metabolizado no fígado e sendo liberado na bile como ácidos biliares ou mesmo como colesterol livre.

Outra parte serve para fabricar membranas celulares. No entanto, quando em excesso, a LDL se deposita nas paredes das artérias, causando a aterosclerose.

A HDL retira o colesterol das artérias, levando-o ao fígado, onde é convertido em bile. Ele também remove o colesterol das placas ateroscleróticas já existentes, diminuindo a velocidade com que se formam. Taxas maiores de HDL reduzem os riscos de problemas cardiovasculares (O'keefe *et al.*, 1996).

Uma alta concentração nos níveis de colesterol LDL na corrente sanguínea e um nível baixo de colesterol HDL aumentam o risco de doenças cardíacas. Os aumentos de LDL associados com alguns fatores de risco como cigarro, hipertensão, histórico familiar, sedentarismo, diabetes, triglicérides alto, obesidade, uso de inibidores de proteases e o uso de drogas, podem aumentar as chances de

adquirirem uma doença cardiovascular (Laurenti *et al.*, 2000).

Anormalidades no processamento e nos níveis de açúcar (diabetes) e de gordura que apresentem altos níveis por um longo período, colocam em risco o organismo de futuras doenças cardíacas (O'keefe *et al.*, 1996). Níveis de colesterol podem variar com a dieta. Portanto, um único resultado alto não é definitivo. O que importa é a tendência aumentada por um determinado período. A maior influência sobre os níveis de colesterol é de ordem genética. Na tabela 4 mostra os valores de referência dos lípidos sanguíneos.

Tabela 4. Valores de referência dos lipídeos sanguíneos.

Valores para adultos (maiores de 20 anos), em mg/dl			
Lípídeo	Desejável	Limítrofe	Riscos
Colesterol total	Abaixo de 200	200 - 240	Acima de 240
LDL colesterol	Abaixo de 130	130 - 160	Acima de 160
HDL colesterol	Acima de 40	35 - 40	Abaixo de 35
Triglicerídeos	Abaixo de 150	150 - 200	Acima de 200

Fonte: Brasil (1998) Referência - Ministério da Saúde do Brasil. Conselho Nacional de Saúde. Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos: resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde Fundação Osvaldo Cruz; 1998.

2.9 Doenças Cardiovasculares

No início deste novo milênio a doença aterosclerótica coronariana (DAC), continua ser a principal causa de morte em todo o mundo. Apesar dos avanços na intervenção e estratégias farmacológicas para o tratamento da doença cardiovascular, um consenso sobre o papel dos fatores nutricionais na etiologia dessas doenças, observou-se que o aumento gradual no consumo de ácidos graxos saturados e gorduras *trans* podem levar a um perfil lipídico pró-aterogênico. Por outro lado, a ingestão de uma alta quantidade de ácidos graxos insaturados e/ou compostos antioxidantes (vitaminas e não-vitaminas) podem reduzir os fatores de risco pró-aterogênico e a susceptibilidade da parede vascular em desencadear eventos pró-inflamatório (Carluccio *et al.*, 2007).

Como os fatores nutricionais são determinantes no aumento da incidência de

doenças cardiovasculares, a dieta é um ponto essencial para estas serem prevenidas.

A dislipidemia esta associada ao processo de aterosclerose, o que constitui a base teórica para a hipótese lipídica. Dislipidemias são distúrbios do metabolismo lipídico com níveis anormais de colesterol total, triglicerídeos, diminuição das concentrações sanguíneas de lipoproteínas de alta densidade ligada ao colesterol (HDL), aumento das concentrações sanguíneas de lipoproteínas de baixa densidade ligadas ao colesterol (LDL) e aumento da concentração sérica da lipoproteína (a) plasmática (composição lipídica semelhante à LDL), e vem sendo considerada como fator de risco independente para a doença arterial coronariana, e estão diretamente associados à gênese e evolução da aterosclerose. A elevada concentração de LDL e da lipoproteína (a), assim como a baixa concentração de HDL plasmática, têm sido consideradas como fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose. Além dessas alterações lipídicas, o estilo de vida sedentário e tabagismo são fatores de risco para o desenvolvimento da placa aterosclerótica (Chor *et al.*, 1999; O'keefe *et al.*, 1996).

Estudos epidemiológicos mostram que o colesterol total juntamente com o aumento da concentração de LDL na corrente sanguínea e associados com alguns fatores como cigarro, hipertensão, stress, histórico familiar, sedentarismo, diabetes, triglicérides alto, obesidade, uso de inibidores de proteases e o uso de drogas (Laurenti *et al.*, 2000) torna-se um dos principais indicadores de risco cardiovascular (Farmer *et al.*, 2011). Além desses fatores, uma nova preocupação em adultos e, potencialmente em crianças, é o surgimento da síndrome metabólica que é um conjunto de fatores de risco para doença cardiovascular, incluindo a resistência à insulina, a elevação da pressão arterial (PA), triacilglicerídeos elevados (TGs) e diminuição nos valores de HDL, tem mostrado estar associada à obesidade. A combinação de níveis altos de TGs e baixos de HDL é denominada dislipidemia aterogênica. Às vezes, acontece em um cenário de dislipidemia mista com a elevação do LDL. A principal abordagem para o tratamento da síndrome metabólica é tratar a obesidade. Em crianças, isso significa diminuir o número de calorias da dieta e aumentar o nível de atividade física para melhorar o balanço energético (Daniels, 2011).

2.9.1 Fatores de Risco das Doenças Cardiovasculares

Vários são os fatores de risco que promovem o aparecimento das doenças cardiovasculares. Todos eles estão relacionados diretamente com o estilo de vida que o indivíduo leva. De acordo com as últimas diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia de 2007, os fatores de risco mais evidentes no panorama da saúde cardiovascular no Brasil são: predisposição genética, tabagismo, aumento da hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes melitus, obesidade e dislipidemias (aumento das concentrações séricas do colesterol total, triglicerídeos, LDL e diminuição do HDL. Ainda que o sedentarismo não tenha sido estratificado no panorama nacional, há algum tempo vem sendo mencionado por diversos autores como um importante fator de risco para as doenças cardiovasculares. Outros fatores de risco estão sendo estudados por sua correlação com as doenças cardiovasculares, como: concentração sanguínea de homocisteína e de lipoproteína (a), fibrinogênio, período pós-menopausa, estresse oxidativo da LDL, hipertrofia ventricular esquerda e fatores psicossociais. No entanto, a modificação através de intervenções no estilo de vida requer maiores estudos (Thomas *et al.*, 1997; Mackinnon *et al.*, 1997).

2.9.2 Nutrição e Dieta nas Coronariopatias

A nutrição adequada pode alterar diminuindo a incidência e a gravidade das coronariopatias. Populações com diferentes dietas apresentam variações na mortalidade cardiovascular. Liu e colaboradores (2000) observaram no Women's Health Study, nos Estados Unidos, em quase 40.000 mulheres profissionais de saúde, que os mais altos consumos de vegetais e frutas (exceto batata) estavam associados ao risco mais baixo de doença cardiovascular, principalmente o infarto.

A American Heart Association (AHA), dos Estados Unidos, enfatiza o consumo de vegetais, frutas e grãos integrais, confirmando a importância das fibras alimentares, antioxidantes e outras substâncias na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. Recomenda ainda a manutenção de peso saudável, auxiliado pela atividade física regular e consumo moderado de gorduras, evitando o consumo excessivo de calorias (AHA, 2000). Gordon e colaboradores (1998) observaram nos estudos de intervenção dietética (entre 1981 e 1997), que as dietas

prescritas pelo National Cholesterol Education Program (NCEP), nos Estados Unidos, tiveram importantes efeitos benéficos nos fatores de risco das doenças cardiovasculares.

As últimas recomendações da American Heart Association (AHA) dos Estados Unidos em relação aos lipídeos para indivíduos com doenças cardiovasculares pré-existentes são: consumo de 25% a 35% de lipídeos, com <7% saturados, até 10% poliinsaturados e <200 mg de colesterol por dia. No entanto, a recomendação para a população em geral é de <30% de gorduras, <10% saturadas, até 10% polinsaturadas e <300 mg de colesterol por dia (Laurenti *et al.*, 2000).

Embora o excesso de lipídeos seja prejudicial, observou-se no Seventh Country Study dos Estados Unidos, que os povos mediterrâneos, com quase 40% de ingestão de gorduras, provenientes na sua maior parte de azeite de oliva, apresentavam menor prevalência de doenças cardiovasculares do que os de outros países como EUA e Holanda, cujo consumo era similar, mas proveniente das gorduras animais (Laurenti *et al.*, 2000).

Os lipídeos que mais contribuem para o aumento do colesterol LDL são os ácidos graxos saturados, os ácidos graxos transisômeros, e, em menor extensão, o colesterol dietético (Santos *et al.*, 2001).

A gordura saturada é a principal causa alimentar de elevação do colesterol plasmático, pois reduz os receptores celulares, inibindo a remoção plasmática das partículas do colesterol LDL, permitindo uma maior entrada do colesterol livre nas partículas do colesterol LDL. Os ácidos graxos saturados estão presentes principalmente na gordura animal (carnes gordurosas, leite integral e derivados), polpa de coco e alguns óleos vegetais (dendê e coco) (Santos *et al.*, 2001).

O excesso de peso e as dislipidemias já estão estabelecidos na literatura científica como fatores determinantes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Castelli *et al.*, 1986).

A associação entre doença aterosclerótica coronariana com concentrações séricas elevadas de colesterol total e de LDL, e as concentrações séricas reduzidas de HDL são fatores intensificadores da aterogênese (Martin *et al.*, 1996). A aterogênese é um processo que tem início na infância, com a formação de estrias gordurosas precursoras das placas ateroscleróticas. Estas começam a surgir na aorta a partir dos 03 anos de idade e, na adolescência, passam a atingir as coronárias, progredindo subseqüentemente nas outras fases do ciclo vital (Brotons

et al., 1998). É um processo que é potencializado no decorrer da vida pela obesidade, predisposição genética, inatividade física, consumo freqüente de gorduras saturadas e trans e hipertensão arterial (Kannel *et al.*, 1995).

2.10 Azeite de Oliva (*Olea europaea* L.) Virgem Extra – Propriedades Físico-Químicas e Terapêuticas

A origem da oliveira na sua forma primitiva, remonta à Era Terciária, anterior ao aparecimento do homem. Está situada na Ásia Menor, provavelmente na Síria ou na Palestina. Nestas regiões foram descobertos vestígios de instalações de produção de azeite e fragmentos de vasos datados do começo da Idade do Bronze. Contudo, em toda a bacia do Mediterrâneo foram encontradas folhas de oliveira fossilizadas, da era do Paleolítico e do Neolítico. A data aproximada que se tem vestígio sobre o primeiro cultivo de oliveiras remonta mais de 5000 anos atrás, na Síria, Líbano e Israel. Os gregos e os romanos da antiguidade disseminaram seu cultivo e o uso alimentar e medicinal e aprenderam com os árabes e hebreus a milenar técnica de extração do azeite (Câmara de Comércio Goiás/Itália, 2004).

É um óleo rico e saboroso produzido a partir do fruto (azeitona) da *Olea europaea* L., que cresce naturalmente na região do Mediterrâneo. Esta espécie é a mais comum, e o gênero *Olea* inclui 35 espécies de árvores e arbustos (Huang *et al.*, 2008).

Estima-se que existam mais ou menos 60 tipos de azeitonas com sabor e características diferenciadas devido à variedade dos climas que estão em todo o mundo. A colheita se efetua em término de poucas semanas, geralmente ao final do mês de novembro e nunca depois do ano novo. Necessita-se por volta de 1.300 à 2.000 azeitonas para elaborar um quarto de litro de azeite de oliva. As azeitonas devem ser colhidas à mão. As que caem das árvores são muito mais ácidas e o azeite sofre uma decomposição de rancidez mais cedo. O cuidado com o qual se colhe as azeitonas resultará na qualidade do produto final, ainda mais o cuidado dos diferentes passos dos processos de extração e centrifugação (Câmara de Comércio Goiás/Itália, 2004).

Na atualidade, os métodos tradicionais de processamento da azeitona deram lugar a processos modernos de extração, utilizando variação de pressão e temperatura. Com isso, o método tradicional de prensagem a frio quase não existe

mais.

A classificação do azeite segue de acordo com o seu processo de produção. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil, através da Secretaria de Defesa Agropecuária, publicou no Diário Oficial da União, Seção 1, de número 166 de 30 de agosto de 2010, a Portaria número 419, de 26 de Agosto de 2010, ISSN 1677-7042 a instrução normativa que aprova o Regulamento Técnico dos Azeites de Oliva e dos Óleos de Bagaço de Oliva, definindo o padrão oficial de classificação.

No capítulo II que rege a classificação e tolerâncias, e no artigo 6º, os azeites de oliva e os óleos de bagaço de oliva, são classificados em tipos, de acordo com o processo de obtenção, os procedimentos tecnológicos aplicados e com os parâmetros de qualidade estabelecidos conforme o disposto a seguir:

I - azeite de oliva virgem extra: produto obtido do fruto da oliveira unicamente por processos mecânicos ou outros meios físicos, sob controle da temperatura, mantendo-se a natureza original do produto; os azeites assim obtidos podem, ainda, ser submetidos aos tratamentos de lavagem, decantação, centrifugação e filtração, observados os valores dos parâmetros de qualidade previstos no Anexo II desta Instrução Normativa;

II - azeite de oliva virgem: produto obtido do fruto da oliveira unicamente por processos mecânicos ou outros meios físicos, sob controle da temperatura, mantendo-se a natureza original do produto; os azeites assim obtidos podem, ainda, ser submetidos aos tratamentos de lavagem, decantação, centrifugação e filtração, observados os valores dos parâmetros de qualidade previstos no Anexo II desta Instrução Normativa;

III - azeite de oliva: produto constituído pela mistura de azeite de oliva refinado com azeite de oliva virgem ou azeite de oliva virgem extra;

IV - azeite de oliva refinado: produto proveniente de azeite de oliva virgem ou azeite de oliva virgem extra mediante técnicas de refino que não provoquem alteração na estrutura glicéridica inicial;

Art. 7º Será considerado fora de tipo o azeite de oliva que exceder os limites estabelecidos para cada tipo em relação aos parâmetros constantes desta Instrução

Normativa.

As Tabelas 5 e 6 apresentam os limites de tolerância de parâmetros de qualidade e identidade dos azeites e óleos de oliva, respectivamente.

Tabela 5. Limites de tolerância de parâmetros de qualidade dos azeites e óleos de oliva.

Tipo	Azeite de Oliva Virgem Extra	Azeite de Oliva Virgem	Azeite de Oliva	Azeite de Oliva Refinado
Acidez Livre (%)	Menor ou igual a 0,80	Menor ou igual a 2,00	Menor ou Igual a 1,00	Menor ou Igual a 0,30
Índice de Peróxidos (mEq/Kg)	Menor ou Igual a 20,0	Menor ou Igual a 20,0	Menor ou Igual a 15,00	Menor ou Igual a 5,00
Extinção específica Ultravioleta* - 270nm	Menor ou Igual a 0,22	Menor ou Igual a 0,25	Menor ou Igual a 0,90	Menor ou Igual a 1,1
Extinção específica Ultravioleta - Delta K	Menor ou Igual a 0,01	Menor ou Igual a 0,01	Menor ou Igual a 0,15	Menor ou Igual a 0,16
Extinção específica Ultravioleta - 232nm	Menor ou Igual a 2,50	Menor ou Igual a 2,60	(**)	(**)

(*) – é o mesmo que absorvidade molar.

(**) - Não se aplica.

Fonte: Diário Oficial da União, seção 1, Nº 166, 30 agosto 2010. ISSN 1677-7042
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa.
Regulamentp técnico dos azeites de oliva e dos óleos de bagaço de oliva.

Tabela 6. Limites de tolerância de parâmetros de identidade dos azeites de oliva.

Tipo	Azeite de Oliva	Azeite de Oliva	Azeite de Oliva	Azeite de Oliva
	Virgem Extra	Virgem		Refinado
18:1t (%) (1)	Menor ou Igual a 0,05		Menor ou Igual a 0,20	
18:2t + 18:3t(%) (1)	Menor ou Igual a 0,05		Menor ou Igual a 0,30	
14:0 (%) (1)	Menor ou Igual a 0,05		Menor ou Igual a 0,05	
16:0 (%) (1)	7,50 a 20,0		7,50 a 20,0	
16:1 (%) (1)	0,3 a 3,5		0,3 a 3,5	
17:0 (%) (1)	Menor ou Igual a 0,3		Menor ou Igual a 0,3	
17:1 (%) (1)	Menor ou Igual a 0,3		Menor ou Igual a 0,3	
18:0 (%) (1)	0,5 a 5,0		0,5 a 5,0	
18:1 (%) (1)	55,0 a 83,0		55,0 a 83,0	
18:2 (%) (1)	3,5 a 21,0		3,5 a 21,0	
18:3 (%) (1)	Menor ou Igual a 1,0		Menor ou Igual a 1,0	
20:0 (%) (1)	Menor ou Igual a 0,6		Menor ou Igual a 0,6	
20:1 (%) (1)	Menor ou Igual a 0,4		Menor ou Igual a 0,4	
22:0 (%) (1)	Menor ou Igual a 0,2		Menor ou Igual a 0,2	
24:0 (%) (1)	Menor ou Igual a 0,2		Menor ou Igual a 0,2	
Colesterol (%) (2)	Menor ou Igual a 0,5		Menor ou Igual a 0,5	
Campesterol (%) (2)	Menor ou Igual a 4,0		Menor ou Igual a 4,0	
Estigmasterol (%) (2)	Menor do que o observado para Campesterol		Menor do que o observado para o Campesterol	
Beta-sitosterol + delta-5,23-estigmastadienol + - Clerosterol + beta Sitotanol + delta-5-Avenasterol + Delta-5,24-Estigmastadienol	Maior ou Igual a 93,0		Maior ou Igual a 93,0	
Esteróis Totais (mg/kg)	Maior ou igual a 1.000		Maior ou igual a 1000	
Eritrodiol e Uvaol (%) (3)	Menor ou igual a 4,5		Menor ou igual a 4,5	

(1) Porcentagem no total de ácidos graxos.

(2) Porcentagem no total de esteróis.

(3) Relativamente aos óleos de bagaço de oliva, os limites podem não ser simultaneamente respeitados.

Fonte: Diário Oficial da União, seção 1, Nº 166, 30 agosto 2010. ISSN 1677-7042
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa.
Regulamento técnico dos azeites de oliva e dos óleos de bagaço de oliva.

A Tabela 7 demonstra os limites de parâmetros de identidade e qualidade para azeites de oliva e dos óleos de bagaço de oliva.

Tabela 7. Limites de parâmetros de identidade e qualidade para azeites de oliva.

Tipo	Azeite de Oliva Virgem Extra	Azeite de Oliva Virgem	Azeite de Oliva	Azeite de Oliva Refinado
Estigmastadienos (mg/kg)	Menor ou Igual a 0,15		-----	
Ceras (mg/Kg)	Menor ou Igual a 250		Menor ou Igual a 350	
Diferença do ECN 42	Menor ou Igual a 0,2		Menor ou igual e 0,3	
Índice de Refração (Raia D a 20°C)	1,4677 a 1,4705		1,4677 a 1,4705	
Índice de Saponificação (mg KOH/g)	184 a 196		184 a 196	
Umidade e material volátil (%)	Menor ou Igual a 0,2		Menor ou Igual a 0,1	
Material Insaponificável (g/kg)	Menor ou Igual a 15		Menor ou Igual a 15	
Impurezas Insolúveis	Menor ou Igual a 0,1%		Menor ou Igual a 0,05%	
Índice de iodo (Wijs)	75 a 94		75 a 92	
Teor de Ferro (mg/kg)	Menor ou Igual a 3		Menor ou Igual a 3	
Teor de Cobre (mg/kg)	Menor ou Igual a 0,1		Menor ou Igual a 0,1	

Fonte: Diário Oficial da União, seção 1, Nº 166, 30 agosto 2010. ISSN 1677-7042 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa. Regulamento técnico dos azeites de oliva e dos óleos de bagaço de oliva.

O azeite de oliva é um óleo de cor amarela, contém 98% de lipídeos e 2% de compostos voláteis insaponificáveis, polifenóis, ésteres, terpenos, pigmentos e tocoferóis. Essas várias substâncias são muito benéficas à saúde. Os ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs), compreendem 72-79% da composição lipídica (Tripoli *et al.*, 2005). Existem outros ácidos graxos, dentre eles estão o poliinsaturado (PUFA), ácido linoléico (2,5-20%), e o ácido graxo saturado palmítico, 10-20% (Conde *et al.*, 2008). Em comparação com os PUFAs, os MUFAs são menos suscetíveis a oxidação, levando por sua vez a uma maior disponibilidade de antioxidantes na forma ativa e melhor estabilidade do azeite (Diniz *et al.*, 2004).

O azeite de oliva é a gordura mais saudável que existe. É um verdadeiro aliado da saúde cardiovascular. Coincidentemente, a longevidade é também uma promessa do azeite de oliva. A vitamina E que está presente neste óleo, protege o organismo contra o câncer, protege as células contra as agressões do meio externo

e protege contra as doenças do coração. O grande consumo de azeite de oliva em toda a região do Mediterrâneo costuma ser associado à alta expectativa de vida dos seus moradores.

O constituinte majoritário do azeite de oliva é o ácido oléico. O ácido oléico é um ácido graxo monoinsaturado que apresenta na sua composição química 18 átomos de carbonos e apenas uma insaturação. Esta configuração molecular lhe confere características importantes. Reduz sensivelmente a síntese de lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol), que é a principal formadora da placa aterogênica nos vasos sanguíneos e, concomitantemente, aumenta os níveis da lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), que transporta o colesterol livre dos tecidos e sangue para o fígado, para ser metabolizado e excretado pelo organismo (Fitó et al., 2007; Granados-Principal et al., 2010). Portanto, está associado a menor incidência de infarto ou acidente vascular cerebral ou periférico. A dislipidemia está associada ao processo de aterosclerose.

O consumo regular do azeite de oliva reduz a formação de placas de ateroma nas paredes dos vasos sanguíneos. Quanto maior a sua proporção na dieta, ajuda a manter os níveis de colesterol dentro dos limites normais no organismo. Essa composição no azeite de oliva ganhou muita atenção devido à sua benéfica implicação na saúde humana reduzindo o risco de aterosclerose e desempenhando um papel protetor nas doenças cardiovasculares (Visoli e Gali, 2002).

O consumo elevado de alimentos ricos em gorduras saturadas aumentam as concentrações do colesterol plasmático. Então, a substituição dietética dessas gorduras saturadas por MUFAs auxiliam na redução do colesterol. Alguns constituintes polifenóis do azeite de oliva virgem são potentes varredores de radicais superóxido e inibem a oxidação da LDL-colesterol (Fitó et al., 2007; Granados-Principal et al., 2010).

Os radicais livres são muito nocivos à saúde, pois são responsáveis pelo envelhecimento, doenças coronarianas e doenças degenerativas, como o câncer. Os polifenóis e os tocoferóis também apresentam efeitos substanciais na anti-aterosclerose (Bester et al., 2010).

Há pelo menos 36 compostos fenólicos estruturalmente distintos que estão presentes no azeite de oliva, como o hidroxitirosol e a oleuropeína. As quantidades destes componentes no azeite de oliva podem variar dependendo de uma série de fatores como: climáticos, o grau de maturação, possíveis infestações, os meios de

produção e armazenamento do azeite (Carluccio *et al.*, 2007).

Esses compostos oferecem benefícios adicionais aos níveis de lipídeos no plasma sanguíneo, quando comparados com o teor de ácidos graxos monoinsaturados. O azeite de oliva apresenta um alto conteúdo fenólico, cerca de 366 mg/Kg, estes níveis relacionam-se com o aumento da HDL, além de reduzir os níveis de triacilglicerídeos, em comparação com azeites que tem baixo teor de polifenóis (Covas *et al.*, 2006). Atua também nas funções de antioxidantes e nas propriedades anti-inflamatórias (Zern *et al.*, 2005). O aumento da HDL é fundamental para remover o excesso de colesterol dos tecidos extra-hepáticos e transportá-lo para o fígado e órgãos (transporte reverso de colesterol) (Carluccio *et al.*, 2007; Granados-Principal *et al.*, 2010).

Os três maiores produtores mundiais de azeite de oliva são a Espanha, Itália e Grécia, seguidos pela Tunísia e Turquia. Outros países com uma considerável produção são Síria, Marrocos, Argélia e Portugal, enquanto França, Líbia, Líbano, Iugoslávia, Egito, Israel e Jordânia vem bem atrás. Dentre os países do Hemisfério Ocidental, temos a Argentina (maior produtor), Estados Unidos e o México. A produção mundial de azeite de oliva alcança mais de 2.000.000 toneladas. Isto representa apenas 4% da produção mundial de óleos vegetais, e 2,5% da produção mundial de óleos comestíveis e gorduras. O Brasil é o sétimo maior importador mundial de azeite de oliva e o segundo de azeitonas. A principal causa é que o país não planta oliveiras (Câmara de comércio Goiás/Itália, 2004).

2.10.1 Dieta do Mediterrâneo

As gorduras prejudiciais à saúde humana são as ricas em ácidos graxos saturados, encontradas principalmente em produtos de origem animal. Ao contrário, as gorduras que contém os ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e os poliinsaturados (PUFAs) são as mais saudáveis, e são encontradas principalmente em óleos vegetais. O azeite de oliva virgem extra é rico em MUFAs e antioxidantes e é um dos produtos mais utilizados no cardápio dos países que circundam o mar Mediterrâneo.

A Dieta do Mediterrâneo inclui uma variedade de cozinhas, como as da Grécia, Espanha, Itália, Marrocos, Tunísia e sul da França. Embora com sabores diversos, todas têm em comum o consumo elevado de verduras, legumes, nozes,

frutas, pão integral, peixe, vinho tinto e grãos, de preferência frescos; a ingestão moderada de leite, carne e frango; e, claro, o uso do azeite de oliva virgem extra. O resultado dessa combinação faz os povos dessas regiões desenvolverem menos doenças e viverem mais. Estes ingredientes fazem desta dieta essencialmente diferente da dieta dos ocidentais e países do norte europeu que possuem teores altos de gorduras saturadas (Carluccio *et al.*, 2007; Benetou *et al.*, 2008; Pauwels, 2011).

Os alimentos vegetais oferecem nutrientes protetores da saúde; as fibras ativam o funcionamento intestinal e ajudam no controle do colesterol; e também são repletos de vitaminas, minerais e antioxidantes, substâncias que bloqueiam reações químicas que desencadeiam tanto doenças como o envelhecimento. Ainda fortalecem as defesas, tornando as membranas das células resistentes à ação dos radicais livres, moléculas instáveis que promovem o envelhecimento celular. As ervas aromáticas, usadas em abundância por esses povos, além de realçar o sabor dos alimentos, dando um toque final às receitas, amplia ainda mais a oferta de antioxidantes (Dasa - Diagnósticos da América, 2009).

Mas a grande estrela da Dieta do Mediterrâneo é o azeite de oliva, especialmente o tipo virgem extra, por ser o mais puro. Ele pode ser comparado ao vinho ou ao suco de fruta, pois preserva os antioxidantes do fruto que lhe dá origem, a azeitona, retardando o processo de envelhecimento celular. Possui uma alta concentração de MUFAs, que favorecem a absorção de nutrientes, como as vitaminas A, D, E e K e ainda reduzem o perigo do enfarto agudo do miocárdio ou o derrame vascular cerebral, promovendo o aumento do HDL (antiaterosclerótico) pois protegem os vasos sanguíneos, removendo o colesterol livre circulante e levando-o ao fígado para ser metabolizado e excretado. Diminuem o LDL, que é o principal agente formador da placa aterogênica prevenindo contra essas doenças (Carluccio *et al.*, 2007; Fitó *et al.*, 2007; Granados-Principal *et al.*, 2010).

A base biológica para a hipótese da dieta do Mediterrâneo tem sido baseada principalmente sobre os efeitos nocivos dos ácidos graxos saturados, e os benefícios dos MUFAs e PUFAs sobre o perfil lipídico, modulando resultados cardiovasculares através de seus efeitos sobre a trombose, a função endotelial, inflamação, obesidade abdominal, a sensibilidade à insulina, o desenvolvimento de diabetes tipo 2 e as arritmias (Calder, 2001; Erkkilä *et al.*, 2008).

Na Grécia, a perspectiva de vida das pessoas que possuem o hábito de

ingerir um cálice do azeite diariamente é por volta dos 100 anos. Isso confirma porque a ilha grega de Creta possui os mais baixos índices de doenças do coração do mundo, pois a população consome 40% das calorias diárias na forma de gordura através do azeite de oliva virgem extra (Câmara de comércio Goiás/Itália, 2004). Além disso, os compostos presentes nos ingredientes da Dieta do Mediterrâneo ajudam a manter saudáveis as taxas de açúcar no sangue; beneficia o cérebro, pois previne o declínio das funções cognitivas relacionadas à idade; reduzem às incidências de doenças degenerativas (como Alzheimer e certos tipos de câncer); protege a pele contra estragos causados pelos raios solares; melhora a digestão; tem efeito laxante e até estimula a absorção de cálcio pelos ossos, prevenindo a osteoporose (Miller, 1999); possuem ação anti-inflamatória e anti-trombogênica, diminuindo o componente tromboxano B2 (TXB2) e leucotrieno B4 (LTB4); inibe a agregação plaquetária, diminuindo ou impedindo a formação de trombos; diminuem a interleucina-6 (IL-6) e proteína C reativa (CPR) que são componentes pró-inflamatórios. A oleuropeína, hidroxitirosol e outros compostos fenólicos, possuem ação anti-microbiana (bactericida) (Cicerale *et al.*, 2009; Saluti Laboratório, 1999).

2.11 Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.)

A família Arecaceae é constituída por um grupo de espécies conhecidas como palmeiras. A palavra palma vem de origem remota. Os povos itálicos aplicavam-na à tamareira (*Phoenix dactylifera*) da África Mediterrânea e do Oriente Médio. Os gregos chamavam-na fóinix, palavra de origem fenícia (Lorenzi, 2006). Os botânicos a denominam de “príncipes das florestas”, pelo porte altaneiro e elegante que as distingue facilmente de outras plantas.

De acordo com Lorenzi (2006) e Amaral (2007), o gênero *Acrocomia* é formado por duas espécies: *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart. e *Acrocomia hassleri* (B. Rodr.) W. J. Hahn. A diferença entre ambas é o tamanho, sendo a primeira a de maior porte. O termo *Acrocomia* deriva do grego “Akron” (uma) e “Kome” (cabeleira) onde as folhas sugerem uma disposição no formato de uma coroa (Henderson *et al.*, 1995; Lorenzi, 2006).

A palmeira *Acrocomia aculeata* foi primeiramente descrita por Jacquin¹ em 1763 tendo como basionônimo *Cocos aculeatus*. Em 1824, foi inserida por Martius² no gênero *Acrocomia*, sendo designada como *Acrocomia sclerocarpa*. Posteriormente, em 1845, Loddiges³ coloca ambos em sinonímia, designando-a como *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. (Missouri, 2005; Lorenzi, 2006).

A palmeira *Acrocomia aculeata* é uma espécie que possui inúmeros nomes populares, dependendo da região de distribuição desta espécie. São: Mbocayá (Argentina); totaí (Bolívia); tamaco (Colômbia); coyol (Costa Rica, Honduras, México); corosse (Haiti). Também, registram-se como nomes populares desta espécie: macaw palm, macaya, groo groo, grugru palm, coquito, mocayá, corozo, cayara, cayiete, palma de vino, gri-gri, mucajá, (Missouri, 2005; Ecocrop, 2005; Fruits, 2005).

No Brasil, possui inúmeros nomes populares como: macaúba, macacauba, macaiba, macaibeira, macajuba, macaúva, mucaia, mucaja e mucajaba, bocaiúva, chiclete-de-baiano, coco-baboso, coco-de-catarro, coco-de-espinho (Teixeira, 1996; Fruits, 2005; Moura *et al.*, 2009), conforme representado na Figura 12.

2.11.1 Características Botânicas da Macaúba

A palmeira macaúba pode atingir a altura de 10 a 15 metros. O tronco possui diâmetro de 20 a 30 centímetros com nós e espinhos pretos afiados com cerca de 10 centímetros de comprimento (Figura 12). As raízes podem ser subterrâneas ou aéreas (Miranda *et al.*, 2001; Lorenzi, 2006). O estipe pode ser coberto pelas bases dos pecíolos, que permanecem aderidas a este por muitos anos. São solitários ou cespitosos e raramente escandentes, aéreos ou subterrâneos. Quando aéreo, pode apresentar-se liso ou densamente coberto por espinhos. As folhas são verde-escuro de forma palmada, pinadas e inteiras, com bainhas abertas ou fechadas e pecíolos curtos ou longos. Geralmente consiste entre 20 e 30 folhas no topo, com comprimento variando de 4 a 5 metros e apresentando aproximadamente 130

¹ JACQUIN, N.J. Von. Selectarum Stirpium Americanarum Historia 278, t. 169. 1763 Disponível em <<http://www.mobot.mobot.org/cgi-bin/search>> Acesso em 16 set 2004.

² MARTIUS, K. F. P. Historia Naturalis Palmarum, v.2, p.. 285-286, 1824.

³ LODDIGES Historia Naturalis Palmarum v.3, n.8, 286p, 1845 Disponível em <<http://www.mobot.mobot.org/cgi-bin/search>> Acessado em 16 set 2004.

folíolos de cada lado e espinhos na região central (Missouri, 2005; Fruits, 2005; Lorenzi, 2006).



Figura 12. Macaúba – *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd.ex Mart. Base das bainhas foliares, cobertas de espinhos escuros e compridos.

Fonte: Nucci, 2007.

O florescimento ocorre quase o ano inteiro, com intensidade nos meses de outubro a janeiro. Entre as folhas surge a espata de até 2 metros de comprimento com inflorescências amarelas. A inflorescência é em espádice, com 50 a 80 cm de comprimento, pendente e protegida por espata de acúleos. As flores geralmente trímeras são unissexuais e ambos os sexos aparecem numa mesma inflorescência (Figura 13).

As flores femininas nascem na base e as masculinas no topo da inflorescência (Lorenzi, 2006).



Figura 13. Inflorescência da macaúba com proteção (espata).
Fonte: Nucci (2007).

2.11.2 Distribuição

As palmeiras representam os símbolos principais das florestas tropicais, porque a maioria das espécies existentes ocorre exclusivamente nos trópicos, representando uma das maiores famílias de plantas, tanto em riqueza e abundância, ocupando quase todos os habitats. No Brasil, 119 espécies são distribuídas, pertencentes a 39 gêneros (Donatti, 2004). A Macaúba é adaptada a ambientes diferentes, incluindo subtropical mais fresco e do ecossistema semi-árido mais seco. A *A. aculeata* habita áreas abertas e com alta incidência de luz solar. Adapta-se a solos arenosos e com baixo índice hídrico e desenvolve-se melhor em locais com solos férteis (Gray, 2005; Missouri, 2005; Lorenzi, 2006). Têm ampla distribuição geográfica e tem preferência para regiões com estação chuvosa bem definida e de baixas altitudes. Ocorre em todo o continente americano, do sul do México a Argentina, Bolívia, Paraguai, Antilhas, Colômbia, exceto Equador e Peru (Henderson *et al.*, 1995; Motta *et al.*, 2002; Bhering, 2010). Há registros de sua ocorrência nos Andes Colombianos cuja altitude é de 1200 metros. Sua área de distribuição tem sido fortemente influenciada pelas atividades humanas. Na Costa Rica, foi introduzida pelos índios na época pré-colombiana, no México e América Central pelos maias (Arboles, 2005; Missouri, 2005; Henderson *et al.*, 1995).

No Brasil ocorrem povoamentos naturais em quase todo território, mas as maiores concentrações estão localizadas em Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, sendo amplamente espalhados pelas áreas de Cerrado (Silva,

1994; Henderson *et al.*, 1995).

2.11.3 Fruto

A palmeira possui grandes cachos (até quinhentos frutos em cada). Os frutos são drupas globosas esféricas ou ligeiramente achatadas em seus pólos, com diâmetro variando de 2,5 a 5,0 cm (Figura 14). O epicarpo (casca) rompe-se facilmente quando maduro. O mesocarpo (polpa) é fibroso, mucilaginoso, de sabor adocicado, rico em glicerídios e carotenóides, com coloração amarela ou esbranquiçada, comestível.

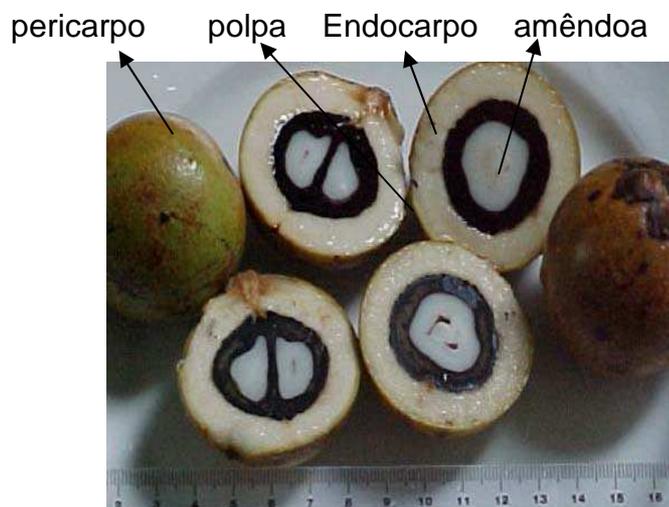


Figura 14. Estruturas do fruto da Macaúba. Fonte: Nucci, 2007.

Cada fruto contém, geralmente, uma semente envolvida por endocarpo com parede óssea dura e enegrecida, fortemente aderida a polpa, com aproximadamente 3 milímetro de espessura (Gray, 2005; Fruits, 2005; Lorenzi, 2006).

A amêndoa é oleaginosa, comestível e com uma fina camada de tegumento (Figura 13) (Lorenzi, 2006). A frutificação ocorre durante todo o ano e os frutos amadurecem entre os meses de setembro a janeiro (Scariot, 1998).

No Pantanal do Mato Grosso do Sul, a maior disponibilidade de frutos maduros ocorre entre os meses de outubro a dezembro, período conhecido regionalmente como safra da macaúba (Galvani *et al.*, 2010).

Um dos principais aspectos para a utilização da macaúba na produção de óleos, deve-se ao fato de seu fruto gerar co-produtos muito valorizados. É uma

espécie potencial para a produção de biodiesel (Teixeira, 2005).

Podem ser aproveitados, além do óleo, os produtos da polpa e da amêndoa (Faria, 2010).

Os frutos são altamente produtivos e podem gerar de 1500 a 5000 kg de óleo por hectare por ano. Podem também gerar uma quantidade significativa de carvão vegetal de alta qualidade produzido a partir de seu endocarpo (Moura *et al.*, 2009).

Na indústria alimentícia segundo Hiane *et al.*, (1989), existe um potencial grande, pois nos frutos maduros foram detectados alta percentagem de β -carotenóide, precursor da vitamina A que tem um alto valor de mercado (Rodrigues-Amaya, 1999).

A polpa e a farinha de macaúba possuem grande mercado, inclusive para outros estados do Brasil, podendo ser usadas na fabricação do sorvete, em vitaminas, bolos e pães, agregando maior valor nutritivo à merenda escolar, pois, também, são ricos em cálcio e potássio (Salis, 2005).

Segundo Pimentel e colaboradores (2011) em estudo de estimativa dos custos de produção e da rentabilidade do cultivo agrícola da macaúba em Minas Gerais (Tabela 8), concluíram que, para fins agroenergéticos é uma atividade rentável, sendo a macaúba uma planta promissora para produção de óleo vegetal.

A produtividade pode ser tão elevada quanto às do dendê, ou seja, até 5000 litros de óleo por hectare por ano.

Tabela 8. Indicadores de produtividade da macaúba na Zona da Mata, considerando sistema silvipastoril no espaçamento 5 x 5 m (400 plantas/ha).

INDICADORES DE PRODUÇÃO		
Descrição	Fase 1 (5 ^o ao 10 ^o ano)	Fase 2 (11 ^o ao 30 ^o ano)
Cachos/palmeira	3,5	3,5
Frutos/cacho	260	350
Peso do fruto (gramas)	45	50
Peso do cacho (Kg)	11,7	17,5
Palmeiras por ha	400	400
Produção de frutos/ha (Kg)	16. 380	24.500

Fonte: Pimentel *et al.*, 2011.

2.11.4 Polpa da Macaúba

A polpa da macaúba na forma *in natura* é consumida pela população local ou nas preparações da culinária regional, tais como sorvetes, bolos, podendo enriquecer a dieta como fonte complementar de nutrientes essenciais (Ramos *et al.*, 2008). A polpa mostrou-se rica em lipídeos totais, carboidratos e fibras (Ramos *et al.*, 2008), conforme mostrado na Tabela 9. A polpa apresenta potencial energético duas vezes superior ao de outra palmeira da região, o buriti (85,9 kcal.100g⁻¹ de polpa integral) e cerca de três vezes superior ao de outros frutos regionais como o caraguatá, pitanga e araticum, araçá e tarumã (apresentaram variação de 39 a 55 kcal.100g⁻¹ de polpa integral) (Caldeira *et al.*, 2004). Os teores de lipídeos e carboidratos encontrados representaram cerca de 40 e 50% da energia total oriunda dos macronutrientes.

Tabela 9. Composição centesimal da polpa de macaúba – *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart., expressa em g.100g⁻¹ de amostra úmida.

Componentes	Média ± DP*
Umidade (% m/m)	52,99 ± 2,88
Resíduo mineral fixo (% m/m)	1,51 ± 0,06
Lipídeos totais (% m/m)	8,14 ± 1,45
Proteínas (% m/m)	1,50 ± 0,04
Glicose (% m/m)	9,47 ± 2,48
Sacarose (% m/m)	0,07 ± 0,17
Amido (% m/m)	12,56 ± 0,48
Fibra por diferença (% m/m)	13,76 ± 4,07
Valor calórico total (Kcal.100g ⁻¹)	167,67 ± 2,56

* Valores médios de 3 determinações ± desvio padrão.

Fonte: Ramos *et al.*, 2008.

A polpa de macaúba é rica em carotenóides e apresentam também tocoferóis em sua composição, mas poucos estudos estão relacionados com a caracterização em relação a composição centesimal. Importantes benefícios para a saúde têm sido atribuídos aos carotenóides, como β -caroteno, eles são convertidos em vitamina A, desempenhando um importante papel nutricional (Siqueira *et al.*, 2007). Além disso, os carotenóides atuam como antioxidantes contra condições de certas doenças cardiovasculares, certos cânceres, distúrbios neurológicos, fortalece o sistema imunológico, degeneração macular relacionada à idade, catarata e nos processos inflamatórios (Gama *et al.*, 2007).

Os tocoferóis também possuem atividade antioxidante, atuam protegendo os ácidos graxos insaturados da oxidação e no corpo humano apresentam atividade biológica na forma de vitamina E (Ching *et al.*, 2001).

Do fruto da macaúba são extraídos dois tipos de óleos. Da amêndoa, é retirado um óleo fino e transparente que representa em torno de 15% do total de óleo da planta, rico em ácido láurico e oléico, tendo potencial para utilizações na indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. Da polpa, é extraído um óleo de cor vermelho amarelado, rico em ácido oléico, palmítico, carotenóides e tocoferóis e tem boas características para o processamento industrial, mas apresenta sérios problemas de perda de qualidade com o armazenamento (Faria, 2010).

Hiane *et al.*, (1990), em estudo dos teores de ácidos graxos e composição centesimal mostraram que o principal ácido graxo encontrado na polpa de macaúba foi o ácido oléico (73%) seguido do ácido palmítico (16%). Sendo o óleo da polpa desse presente estudo composto por (79%) de ácidos graxos insaturados e 21% de ácidos graxos saturados. Em estudo mais recente, com a polpa *in natura*, farinha da polpa e óleo da amêndoa, Hiane *et al.*, 2005, reportaram teor de ácidos graxos monoinsaturados de 66,9% com predominância de ácido oléico. Já para ácidos graxos saturados e poliinsaturados foram de 25,52% e 7,62% conforme apresentado na Tabela 10. Estas variações podem estar associadas com a diversidade biológica observada nesta espécie.

Atualmente, verifica-se a utilização de óleos vegetais em diversos fins industriais. O óleo da polpa de macaúba vem sendo beneficiado em saboarias devido ao rápido aumento da acidez, devido ao alto teor de água, à característica de maturação fisiológica e a ação de microrganismos lipolíticos (Carvalho, 2010).

Tabela 10. Composição de ácidos graxos (%) da polpa *in natura*, farinha de polpa e do óleo de amêndoa da macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex. Mart.) do estado de Mato Grosso do Sul.

Ácido graxo	Polpa	Farinha da polpa	Óleo da Amêndoa
Caprílico	0,45	0,41	5,96
Cáprico	0,27	0,23	1,79
Laurico	1,97	1,98	12,95
Mirístico	0,45	1,42	9,49
Palmítico	15,96	18,53	12,62
Palmitoleico	1,01	4,19	2,29
Esteárico	5,92	4,88	6,58
Oleico	65,87	62,16	40,17
Linoléico	5,10	4,03	5,91
Linolênico	2,52	2,74	1,92
Araquídico	0,50	0,53	0,30
Ácidos graxos Saturados	25,52	26,98	49,69
Ácidos graxos Monoinsaturados	66,88	66,35	42,46
Ácidos graxos Poliinsaturados	7,62	6,77	7,83

Fonte: Hiane *et al.*, 2005.

Outra importante alternativa é a revitalização do uso do óleo de macaúba como óleo de cozinha dado sua similaridade com o azeite de oliva (Ramos *et al.*, 2008). Este óleo possui altas percentagens de ácidos graxos monoinsaturados, alto teor de ácido oléico, que reduz sensivelmente o LDL-colesterol, formador da placa aterogênica nos vasos sanguíneos. Concomitantemente, o ácido oléico influencia no aumento dos níveis de HDL-colesterol, que apresenta um importante papel no transporte do colesterol livre na corrente sanguínea, levando até o fígado para ser metabolizado e excretado pelo organismo.

Para o Brasil, economicamente, é interessante a exploração do óleo da polpa de macaúba pelas indústrias. Este óleo possui uma semelhança muito grande em termos de composição química em ácidos graxos com o azeite de oliva. Também pode ser um substituto para o óleo de palma, que é muito usado na indústria de alimentos (frituras), mas que apresenta alto teor de ácidos graxos saturados. É esperado que o interesse econômico sobre esta espécie aumente em consequência da crescente campanha publicitária destacando, principalmente, o valor econômico e a rentabilidade do óleo e co-produtos (Pinto, 2003; Negrelle *et al.*, 2003; Pinto, 2004; Lorenzi, 2006).

Segundo Silva (2009), o processamento da macaúba compreende diversas fases que vão desde a produção e colheita do coco até o beneficiamento final dos produtos derivados. A etapa de pós-colheita do fruto é ainda muito pouco estudada e a extração do óleo é feita aplicando-se tecnologias adaptadas de outras oleaginosas. Estes fatores contribuem para a baixa qualidade do óleo comercializado no cerrado brasileiro. Pelo fato da macaúba ser uma planta nativa, podem ocorrer variações na concentração de óleo da polpa, sendo assim a produtividade em óleo passa a ser regulada por fatores ambientais, como disponibilidade de água e nutrientes, temperatura, fotoperíodo, entre outros. Também deve ser considerada a metodologia empregada para a extração do óleo, assim como a determinação quantitativa que nem sempre segue a métodos padronizados (Amaral *et al.*, 2011).

O Brasil é um grande importador de azeite de oliva, pois o país não cultiva oliveiras. Diferentemente, a macaúba é uma planta nativa e encontrada praticamente em quase todo território nacional. Equacionando-se a questão do processamento e demonstrando-se os benefícios à saúde similares entre ambos os óleos, poder-se-ia motivar o plantio e industrialização do óleo de macaúba. Potencialmente o custo final

do óleo de polpa de macaúba deva ser inferior ao praticado para oliva, fazendo com que seja mais acessível à população brasileira. Os ganhos poderão ser de maior aporte em micronutrientes (carotenóides e tocoferóis) precursores da vitamina A e E e, a longo prazo, redução de doenças cardiovasculares.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo principal caracterizar físico-quimicamente o óleo da polpa de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart.) e azeite de oliva virgem extra (*Olea europaea* L.), e identificar os efeitos sobre dislipidemia e outros parâmetros sanguíneos, tecido hepático, parâmetros corporais e mutagênese em ratos.

3.2 Objetivos Específicos (Capítulo 2)

1. Caracterizar físico-quimicamente o óleo da polpa de macaúba e o azeite de oliva virgem extra.
2. Avaliar o efeito sobre dislipidemias e outros parâmetros sanguíneos após suplementação com óleo da polpa de macaúba e com o azeite de oliva virgem extra em ratos *Wistar* através de exames bioquímicos.
3. Avaliar o ganho de massa corporal e acúmulo de tecido adiposo nos ratos *Wistar*.
4. Avaliar alterações anatomopatológicas no fígado dos ratos *Wistar*.
5. Avaliar alterações mutagênicas em células sanguíneas dos ratos *Wistar*.

REFERÊNCIAS

AHA. American Heart Association. AHA Scientific Statement. Dietary (middle-class). Revision. A statement for health care professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation*. v.102, n.22, p.4-99, 2000.

AMARAL, F.P. (2007). Estudo das características físico-químicas dos óleos da amêndoa e polpa da macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". [Dissertação de Mestrado].

AMARAL, F.P.; BROETTO, F.; BATISTELLA, C.B.; JORGE, S.M.A. Extração e caracterização qualitativa do óleo da polpa e amêndoas de frutos de Macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart] coletada na região de Botucatu – SP. *Revista Energia na Agricultura*, v.26, n.1, p.12-20, 2011.

ARBOLES del area del canal de Panamá *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. Disponível em: <<http://www.ctfs.si.edu/webatlas/spanish/acropa.html>> Acesso em: 18 jul. 2005.

ARCOS, J. A.; BERNABÉ, M.; OTERO, C. *Biotechnol. Bioeng.* 57 (1998) 505.

BARTER, P.J.; NICHOLLS, S.; RYE, K.A.; ANANTHARAMAIAH, G.M.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A.M. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res.*, v.95, n.8, p.764-72, 2004.

BENETOU, V.; TRICHOPOULOU, A.; ORFANOS, P.; NASKA, A.; LAGIOU, P.; BOFFETTA, P.; TRICHOPOULOS, D. Conformity to traditional Mediterranean diet and cancer incidence: the Greek EPIC cohort. *Br J Cancer.*, v.99, p.191-195, 2008.

BESTER, D.; ESTERHUYSE, A.J.; TRUTER, E.J.; VAN ROOYEN, J. Cardiovascular effects of edible oils: a comparison between four popular edible oils. *Nutr Res Rev.*, v.23, n.2, p.334-48, 2010.

BHERING, L. Macaúba: Matéria - prima nativa com potencial para a produção de biodiesel. Disponível em: <<http://www.cnpae.embrapa.br/artigos-de-divulgacao/macauba-materia-prima-nativa-com-potencial-para-producao-de-biodiesel.pdf/view>>. Janeiro 2010. Acesso em: 09 de maio de 2011.

BLASOILE, D.A; DAVIS, R.A.; ATTIE, A.D. The physiological and molecular regulation of lipoprotein assembly and secretion. *Mol. Biosyst.*, v.3, p.608-619, 2007.

BRASIL (1998). Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos: resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz; 1998.

BREWER, H.B. The Evolving Role of HDL in the Treatment of High-Risk Patients with Cardiovascular Disease. *J Clin Endocrinol Metab.*, v.96, n.5, p.1246–1257 2011.

BROTONS, C.; RIBERA, A.; PERICH, R.M.; ABRODOS, D.; MAGANÃ, P.; PABLO, S. Worldwide distribution of blood lipids and lipoproteins in childhood and adolescence: a review study. *Aterosc.*, v.139, p.1-9, 1998.

BROWN, H.A.; MURPHY, R.C. Working towards an exegesis for lipids in biology. *Nat. Chem. Biol.*, v.5, n.9, p.602-606, 2009.

BRUICE, Paula Yurkanis. *Química Orgânica*. 4. ed. Editora Pearson Prentice Hall. São Paulo, 2006.

CÂMARA DE COMÉRCIO GOÍAS / ITÁLIA, (2004). Aboissa óleos vegetais (www.aboissa.com.br). Acesso em 16 jun 2011.

CALDEIRA, S. D.; HIANE, P. A.; RAMOS, M.I.L.; RAMOS FILHO, M.M. Caracterização físico-química do araçá (*Psidium guineense* SW.) e do tarumã (*Vitex cymosa* Bert.) do Estado de Mato Grosso do Sul. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v.22, n.1, p.145-154, 2004.

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids*, v.36, p.1007-1024, 2001.

CARLUCCIO, M.A.; MASSARO, M.; SCODITTI, E.; DE CATERINA, R. Vasculoprotective potential of olive oil components. *Mol. Nutr. Food Res.*, v.51 p.1225-1234, 2007.

CARPENTIER, Y.A.; PORTOIS, L.; MALAISSE, W.J. n-3 fatty acids and the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr.*, v.83, n.6, p.1499-1504, 2006.

CARVALHO, F.M. (2010). Influência da temperatura do ar de secagem e da utilização do ácido etilenodiaminotetracético na qualidade do óleo e caracterização do fruto de macaúba. Viçosa: Universidade de Viçosa. [Dissertação de Mestrado].

CASTELLI, W. P.; GARRISON, R.J.; WILSON, P.W.F.; ABBOTT, R.D.; KALOUSDIAN, S.; KANNEL, W.B. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA*, v.256, p.2835-8, 1986.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v.27, p.146-156, 2004.

CICERALE, S.; CONLAN, X. A.; SINCLAIR, A. J.; KEAST, R. S. J. Chemistry and Health of Olive Oil Phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49:3, 218-236. 2009. Taylor & Francis.

CHING, L.S.; MOHAMED, S. Alpha-tocopherol content in 62 edible tropical plants. *J Agri Food Chem.*, v.49, p.3101-3105, 2001.

CHOR, D.; FONSECA, M.J.M.; ANDRADE, C.R.; WAISMANN, W.; LOTUFO, P.A. (1999). Doenças cardiovasculares: panorama da mortalidade no Brasil. In: Minayo MC editor. Os miolos Brasis. Rio de Janeiro, 2ª Edição.

CLARO, R.D. O mal do novo século. Rev Educação & Família, v.6, n.1, p.20-27, 2004.

COHEN, J.C.; HORTON, J.D.; HOBBS, H.H. Human fatty liver disease: old questions and new insights. Science., v.332, p.1519-1523, 2011.

CONDE, C.; GERÓS, S.D.H. Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. J Plant Phys., v.165, n.15, p.1545-1562, 2008.

COSTA, R. G.; CARTAXO, F. Q.; SANTOS, N. M.; QUEIROGA, R. C. R. E. Carne caprina e ovina: composição e características sensoriais. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal. v. 9, n. 03, p. 497-506, 2008.

COVAS, M.I.; NYSSONEN, K.; POULSEN, H.E.; KAIKKANEN, J.; ZUNFT, H.J.F.; KIESEWETTER, H.; GADDI, A.; TORRE, R.; MURSU, J.; BAÜMLER, H.; NASCETTI, S.; SALONEN, J.T.; FITÓ, M.; VIRTANEN, J.; MARRUGAT, J. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. Ann. Intern. Med., v.145, p.333-341, 2006.

DANIELS, S.R. Screening and Treatment of Dyslipidemias in Children and Adolescents. Horm Res Paediatr., v.76, p.47-51, 2011.

DAS, U.N. Essential fatty acids – a review. Curr Pharm Biotechnol., v.7, p.467-82, 2006.

DANTAS, M.B.; ALMEIDA, A.A.F.; CONCEIÇÃO, M.M.; FERNANDES JR, V.J.; SANTOS, I.M.G.; SILVA, F.C.; SOLEDADE, L.E.B.; SOUZA, A.G. Characterization and kinetic compensation effect of corn biodiesel. J Therm Anal Calorim., v.461, n.79, p.112-117, 2007.

DASA, DIAGNÓSTICOS DA AMÉRICA. 2009. Perfil lipídico. <<http://www.dasa.com.br/>> Acesso em 12 de março de 2011.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO (DOU). 30 de agosto de 2010. Seção 1, Nº 166. ISSN 1677-7042 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa. Regulamento técnico dos azeites de oliva e dos óleos de bagaço de oliva.

DINIZ, Y.S.A.; CICOGNA, A.C.; PADOVANI, C.R.; SANTANA, L.S.; FAINE, L.A.; NOVELLI, E.L.B. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: metabolic shifting and cardiac health. Nutrition, v.20, p.230-234, 2004.

DONATTI, C.I. (2004). Conseqüências da defaunação na dispersão de sementes e no recrutamento de plântulas da palmeira brejaúva (*Astrocarium aculeatissimum*) na Mata Atlântica. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. [Dissertação de Mestrado].

DORFMAN, S.E.; LAURENT, D.; GOUNARIDES, J.S.; LI, X.; MULLARKEY, T.L.; ROCHEFORD, E.C.; SARI-SARRAF, F.; HIRSCH, E.A.; HUGHES, T.E.; COMMERCORFORD, S.R. Metabolic implications of dietary trans-fatty acids. *Obesity*, v.17, n.6, p.1200-1207, 2009.

ECKEL, R.H. *Metabolic Risk for Cardiovascular Disease*, 2010. 254p.

ECOCROP *Acrocomia aculeata*. Disponível em:<<http://ecotrop.fao.org>> Acesso em: 12 nov. 2005.

ERKKILÄ, A.; MELLO, V.D.; RISÉRUS, U.; LAAKSONEN, D.E. Dietary fatty acids and cardiovascular disease: an epidemiological approach. *Prog Lipid Res.*, v.47, n.3, p.172-187, 2008.

FARIA, LA. (2010). Hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba com lipase extracelular de *Colletotrichum gloesporioides* produzida por fermentação em substrato líquido. [Dissertação de Mestrado].

FARMER, J.A.; LIAO, J. Evolving Concepts of the Role of High-Density Lipoprotein in Protection from Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.*, v.13, p.107-114, 2011.

FERSTL, P.; GILLIG, S.; KAUFMANN, C.; DÜRR, C.; EDER, C.; WIERSCHEM, A.; RUSS, W. Pressure-induced phase transitions in triacylglycerides. *Ann N Y Acad Sci.*, v.1189, p.62-67, 2010.

FITÓ, M.; GUXENS, M.; CORELLA, D. Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med.*, v.167, p.1195-203, 2007.

FRUITS from America: an ethnobotanical inventory *Acrocomia aculeata*. Disponível em:<http://www.ciat.cgiar.org/ipgri/fruits_from_americas/frutales/Acrocomiaaculeata.htm> Acesso em: 8 set. 2005.

FUENTES, J.A.S.; CAMEY-ORTÍZ, G.; HERNÁNDEZ-MEDEL, M.R.; MENDOZA, F.P.; BAZÚA, C.D. Composition phase behavior and thermal stability of natural edible fat from rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) seed. *Bioresource Technology*, v.101, p.799-803, 2010.

FUCHS, B.; SÜSS, R.; TEUBER, K.; EIBISCH, M.; SCHILLER, J. Lipid analysis by thin-layer chromatography--a review of the current state. *J Chromatogr A.*, v.1218, n.19, p.2754-2774, 2011.

GALVANI, F.; SANTOS, J.F. (2010). Estudo do Efeito da Temperatura de Secagem sobre Alguns Parâmetros Nutricionais da Polpa e da Farinha de Bocaiúva. 5º Simpósio sobre Recursos Naturais Socioeconômicos do Pantanal.

- GAMA, J.J.T.; SYLOS, C. M. Effect of thermal pasteurization and concentration on carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice. *Food Chem.*, v.100, p.1686-1690, 2007.
- GIANINI S.D. (1998). *Aterosclerose e dislipidemias*. São Paulo: BG Editora e Produções Culturais, 1ª Edição.
- GIBBONS, W.S.; PATEL, H. M.; KUSY, R. P. *Polymer* 38 (1997) 2633.
- GIMPL, G.; GEHRIG-BURGER, K. Probes for studying cholesterol binding and cell biology. *Steroids*, v.76, n.3, p.216-31, 2011.
- GORDON, N.F. (1998). Conceptual basic for eoronan, artery dísease facíor assessment. In: *ACSM Resource manual for guidelines for exercise teslino and prescption*. 3- cd. USA: Williams & Wilkins. 3-12.
- GORDON, S.M.; HOFMANN, S.; ASKEW, D.S.; DAVIDSON, W.S. High density lipoprotein: it's not just about lipid transport anymore. *Trends Endocrinol Metab.*, v.22, n.1, p.9-15, 2011.
- GRANADOS-PRINCIPAL, S.; QUILES, J.L.; RAMÍREZ-TORTOSA, C.L.; SÁNCHEZ-ROVIRA, P.; RAMÍREZ-TORTOSA, M.C. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutr Rev.*, v.68, p.191-206, 2010.
- GRAY, M. Palm and Cycad Societies of Australia. Disponível em: <<http://www.pacsoa.org.au/palms/Acrocomia/aculeata.html>> Acesso em: 20 set. 2005.
- HARPER, H. A. *Bioquímica*. Editora Atheneu, 9ª Ed., 2002.
- HARTMANN, T.; KUCHENBECKER, J.; GRIMM, M.O.W. Alzheimer's disease: the lipid connection. *J Neurochem.*, v.103, n.1, p.159-170, 2007.
- HAUGHEY, N.J.; STEINER, J.; NATH, A.; MCARTHUR, J.C.; SACKTOR, N.; PARDO, C. Converging roles for sphingolipids and cell stress in the progression of neuro-AIDS. *Front Biosci.*, v.13, p.5120-5130, 2008.
- HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. *Field Guide to the Palms of the Americas* New Jersey: Princepton University, 1995. p.166-167.
- HEWITT, S.C.; HARRELL, J.C.; KORACH, K.S. Lessons in estrogen biology from knockout and transgenic animals. *Annu. Rev. Physiol.*, v.67, p.285-308, 2005.
- HIANE, P. A.; PENTEADO, M. V. C. Carotenóides de valores de vitamina A do fruto e da farinha de bocaiúva (*Acrocomia mokayayba* Barb. Rodr.) do Estado do Mato Grosso do Sul. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*. v.25, n. 2, p. 158-168, 1989.

HIANE, P.A.; PENTEADO, M.V.C.; BADOLATO, E. Teores de ácidos graxos e composição centesimal do fruto e da farinha da bocaiúva (*Acrocomia makayáya* Barb. Rodr.). Alim. Nutr., v.2, p.21-26, 1990.

HIANE, P.A.; FILHO, M.M.R.; RAMOS, M.I.L.; MACEDO, M.L.R. Óleo da polpa e amêndoa de bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (jacq.) lodd. Caracterização e composição em ácidos graxos. Braz. J. Food Technol., v.8, n.3, p.256-259, 2005.

HOOD, R.L. A note of the cholesterol content of beef rib steaks. CSIRO FoodResearch., v.47, p.44-46, 1987.

HUANG, C.L.; SUMPIO, B.E. Olive Oil, the Mediterranean Diet, and Cardiovascular Health. J Am Coll Surg., v.207, n.3, p.407-416, 2008.

HUNTER, J.E. Dietary trans fatty acids: review of recent human studies and food industry responses. Lipids, v.41, p.967-992, 2006.

HUNTER, J.E.; ZHANG, J.; KRIS-ETHERTON, P.M. Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with trans, other saturated, and unsaturated fatty acids: a systematic review. Am J Clin Nutr., v.91, n.1, p.46-63, 2010.

HURLEY, B.F. Effects of resistive training on lipoprotein-lipid profiles: a comparison to aerobic exercise training. Med Sci Sports Exerc., v.21, p.689-693, 1989.

INNIS, S. H. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. J Pediatr. 2003; 143(4 Suppl):S1-8.

JÄNIS, M.; LAAKSONEN, R.; ORESIC, M. Metabolomic strategies to identify tissue specific effects of cardiovascular drugs. Exp. Opin. Drug. Metab. Toxicol., v.4, n.6, p.665-680, 2008.

JACQUIN, N.J. von. Selectarum Stirpium Americanarum Historia 278, t. 169. 1763 Disponível em <<http://www.mobot.mobot.org/cgi-bin/search>> Acesso em 16 set 2004.

KADDURAH-DAOUK, R.; MCEVOY, J.; BAILLIE, R.A.; LEE, D.; YAO, J.K.; DORAISWAMY, P.M. Metabolomic mapping of atypical antipsychotic effects in schizophrenia. Mol Psychiatry., v.12, n.10, p.934-945, 2007.

KANNEL, W.B.; WILSON, P.W.F. An update on coronary risk factors. Med Clin North Am., v.79, p.951-71, 1995.

KISHAN, A.U.; MODJTAHEDI, B.S.; MARTINS, E.N.; MODJTAHEDI, S.P.; MORSE, L.S. Lipids and Age-related Macular Degeneration. Surv Ophthalmol., v.56, n.3, p.195-213, 2011.

KWON, H.J.; ABI-MOSLEH, L.; WANG, M.L.; DEISENHOFER, J.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S.; INFANTE, R.E. Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. Cell, v.137, n.7, p.1213-1224, 2009.

KUKSIS, A. (2005). Lipids – Overview. KWON, H.J; ABI-MOSLEH, L.; WANG, M.L.; DEISENHOFER, J.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S.; INFANTE, R.E. (2009). Structure of N-Terminal Domain of NPC1 Reveals Distinct Subdomains for Binding and Transfer of Cholesterol. *Cell*. 137(7): 1213-1224.

LAURENTI, R.; BUCHALLA, C.M.; CARATIN, C.V.S. Doença do coração Internações, tempo de permanência e gastos. Brasil, 1993 a 1997. *Ara BrasCardiol.*, v.74, n.6, p.483-487, 2000.

LEANÇA, C.C.; PASSARELLI, M.; NAKANDAKARE, E.R.; QUINTÃO, E.C.R. HDL: o yin-yang da doença cardiovascular. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, v.54, n.9, p.777-784, 2010.

LIU, S.; MANSON, J.E.; LEE, I.; COLE, S.R.; HENNEKINS, C.H.; WILLETT, W.C. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the women's health study. *Am J Clin Nutr.*, v.72, n.4, p.922-928, 2000.

LODDIGES *Historia Naturalis Palmarum* v.3, n.8, 286p, 1845 Disponível em <<http://www.mobot.mobot.org/cgi-bin/search>> Acessado em 16 set 2004.

LORENZI, G.M.A.C. (2006). *Acrocomia aculeata* Arecaceae: Bases para o extrativismo sustentável. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. [Tese de Doutorado].

MACKINNON, L.T.; HUBINGER, L.; FRANK, L. Effects of physical activity and diet on lipoprotein(a). *Med Sci Sports Exerc.*, v.29, p.1429-36, 1997.

MANFIOL, E.C.; MOTOIKEL, S.Y.; SANTOS, C.E.M.; PIMENTEL, L.D.; QUEIROZ, V.; SATO, A.Y. Repetibilidade em características biométricas do fruto de macaúba. *Ciência Rural*, v.41, n.1, p.70-76, 2011.

MARTIN, I.S. Doenças cardiovasculares ateroscleróticas, dislipidemia, hipertensão, obesidade e *diabetes melitus* em população da área metropolitana da região Sudeste do Brasil: II Dislipidemia. *Rev Saúde Pública*, v.30, n.1, p.82-89, 1996.

MARTIN, C.A.; ALMEIDA, V.V.; RUIZ, M.R.; VISENTAINER, J.E.L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev Nutr.*, v.19, n.6, p.761-770, 2006.

MARTIUS, K.F.P. *Historia Naturalis Palmarum*. 2: 285-286, 1824.

MAYER, A.M.; PALIJAKOFF-MAUBER, A. The germination of seeds. Pergamon Press, 1975. 263p.

MEDINA-GOMEZ, G.; GRAY, S.; YETUKURI, L.; SHIMOMURA, K.; CAMPBELL, M.; CURTIS, K. PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS Genet.*, v.3, n.4, p. 64, 2007.

MENOTTI, A.; LANTI, M.; PUDDU, P.E.; KROMHOUT, D. Coronary heart disease incidence in northern and southern European population: a reanalysis of seven countries study for a European coronary risk chart. *Heart*, v.84, p.238-244, 2000.

MILLER, Otto. *Laboratório para o clínico*. 8.ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

MINEO C, DEGUCHI H, GRIFFIN J. H., SHAUL P. W. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res*. 2006;98(11):1352-64.

MIRANDA, I.P.A.; RABELO, A.; BUENO, C. R.; BARBOSA, E. M.; RIBEIRO, M. N. S. Frutos de Palmeiras da Amazônia. Manaus: MCT INPA, 2001. p. 7-10

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. *Acrocomia aculeata* Disponível em: <<http://www.mobot.mobot.org/cgi-bin/search>> Acesso em: 16 out. 2005.

MONTEIRO, C. A, D'A BENÍCIO, M.H.; CONDE, W.L.; POPKIN, B.M. Shifting obesity trends in Brazil. *Eur J Clin Nutr.*, v.54, p.342-346, 2000.

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

MOTTA, P.E.F.; CURI, N.; OLIVEIRA-FILHO, A.T.; GOMES, J.B.V. Ocorrência da macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. *Pesq. Agropec.Bras.*, v.37, n.7, p.1023-1031, 2002.

MOTTA, V.T. *Bioquímica Clínica para o Laboratório*, 5 ed. Medbook, 2009. 400p.

MOURA, E.L.; MOTOIKE, S.Y.; VENTRELLA, M.C.; SÁ JÚNIOR, A.Q.; CARVALHO, M. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. *Scientia Horticulturae*, v.119, n.4, p.447-454, 2009.

MOZAFFARIAN, D.; ARO, A.; WILLETT, W.C. Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence. *Eur J Clin Nutr.*, v.63, p.S5-S21, 2009.

MOZAFFARIAN D, STAMPFER MJ. Removing industrial trans fat from foods. *BMJ*. 2010; 15:c1826.

NEGRELLE, R. R. B et al. Composição e estrutura do componente arbóreo de remanescente de Floresta Estacional Semidecidual da RPPN SESC Pantanal (Barão de Melgaço/MT) In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 54, REUNIÃO AMAZÔNICA DE BOTÂNICA, 3, 2003, Belém. Resumos. Belém, 2003. 1 CR-Rom.

NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Editora Sarvier, 5ª Edição, 2010.

NEWTON, A.C. Lipid activation of protein kinases. *J. Lipid Res.*, v.50, p.266-271, 2009.

NICKLAS, J.B.; KATZEL, L.I.; BUSBY-WHITEHEAD, J.; GOLDBERG, A.P. Increases high-density lipoprotein cholesterol with endurance exercise training are blunted in obese compared with lean men. *Metabolism*, v.46, p.556-61, 1997.

NIU, Y.G.; EVANS, R.D. Very-Low-Density Lipoprotein: Complex Particles in Cardiac Energy Metabolism. *J Lipids.*, p.1-9, 2011.

NUCCI, S. M. (2007). Desenvolvimento caracterização e análise da utilidade de marcadores microssatélites em genética de população de macaúba. Dissertação (Mestrado em agricultura tropical e subtropical). 82p. Instituto Agrônomo, Campinas – SP.

O'KEEFE, J.H.; NELSON, J.; HARNS, W.B. Life-style change for coronary artery disease. *Postgrad Med.*, v.99, n.2, p.89-106, 1996.

ORESIC, M.; HÄNNINEN, V.A.; VIDAL-PUIG, A. Lipidomics: a new window to biomedical frontiers. *Trends Biotechnol.*, v.26, n.12, p.647-652, 2008.

ORESIC, M. Metabolomics, a novel tool for studies of nutrition, metabolism and lipid dysfunction. *Nutr Met Cardio Dis.*, v.19, p.816-824, 2009.

PAUWELS, E.K. The protective effect of the Mediterranean diet: focus on cancer and cardiovascular risk. *Med Princ Pract.*, v.20, n.2, p.103-111, 2011.

PIMENTEL, L.D.; MOTOIKE, S.Y.; COSTA, E.W.A.; MANFIO, C.E.; BRUCKNER, C.H. (2011). Estimativa de custo de produção e viabilidade econômica do cultivo da palmeira macaúba (*Acrocomia aculeata*) para produção de óleo vegetal. Disponível em: <http://www.entabanbrasil.com.br/downloads/Estudo-de-Viabilidade-Economica-Macauba-Leonardo-Pimentel.pdf>. Acessado em: 28/09/2011.

PINTO, E. C. T. Subsídios ao entendimento da dinâmica de exploração e comercialização de espécies arbóreas nativas do Pantanal Mato-grossense. Curitiba, 2003. 51f. Monografia.(Graduação Ciências Biológicas), Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PINTO, G. B. S. Subsídios à geração de propostas de desenvolvimento para a região de Joselândia (Barão de Melgaço/MT): estudo etnobotânico. Curitiba, 2004. 144f. Monografia.(Graduação Ciências Biológicas), Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PIKULEVA, I.A. Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis. *Pharmacol Ther.*, v.112, n.3, p.761-73, 2006.

PUCADYIL, T.J.; CHATTOPADHYAY, A. Role of cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors. *Prog Lipid Res.*, v.45, p.295-333, 2006.

RAMOS, M.I.L.; RAMOS FILHO, M.M.; HIANE, P.A.; BRAGA NETO, J.A.; SIQUEIRA, E.M.A. Qualidade nutricional da polpa de bocaiúva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.28, p.90-94, 2008.

- REPA, J.J.; MANGELSDORF, D.J. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, v.16, p.459–481, 2000.
- REZEN, T.; ROZMAN, D.; PASCUSI, J.M.; MONOSTORY, K. Interplay between cholesterol and drug metabolism. *Biochim Biophys Acta*, v.1814, n.1, p.146-160, 2011.
- RIBEIRO, K.C.; SHINTAKU, R.C.O. The influence of the lipids of the diet on atherosclerose. *ConScientiae Saúde*, v.3, p.73-83, 2004.
- RODRIGUES-AMAYA, D. B. Latin American food sources of carotenoids *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, Guatemala, v.49, n.1, p.74-84, 1999.
- ROOS N.M., BOTS M.L., KATAN M. B., (2001). Replacement of dietary saturated fatty acids by trans fatty acids lowers serum HDL cholesterol and impairs endothelial function in healthy men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1233–1237.
- RUSSO, G.L. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem Pharmacol.*, v.77, p.937-946, 2009.
- SALIS, S. M.; JUARACY, A. R. da M. A utilização da bocaiúva no Pantanal. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br>> Acesso em: 16 dez. 2005.
- SALUTI LABORATÓRIO. Recomendações gerais para a realização do perfil lipídico. Laboratório para o clínico. 8.ed. São Paulo: Atheneu, 1999.
- SANTOS, R.D.; MARANHÃO, R.C.; UZ, P.L.; LIMA, J.C.; FILHO, W.S, AVCZUM, A. (2001). III Diretrizes Brasileiras sobre dislipidemias e diretrizes de prevenção da aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade brasileira de Cardiologia.
- SCARIOT, A. Seed dispersal and predation of the palm *Acrocomia aculeata*. *Principes*, Brasília, v.42, n.1, p.5-8, 1998.
- SCHAEFER, E.J. Lipoproteins, nutrition, and heart disease. *Am J Clin Nutr.*, v.75, p.191-212, 2002.
- SCHUCHARDT, U.; SHERCHELI, R.; VARGAS, R.M. Transesterification of Vegetable Oils: a Review. *J Braz Chem Soc.*, v.9, p.199-210, 1998.
- SCHWARZ, E.; PRABAKARAN, S.; WHITFIELD, P.; MAJOR, H.; LEWEKE, F.M.; KOETHE, D. High throughput lipidomic profiling of schizophrenia and bipolar disorder brain tissue reveals alterations of free fatty acids, phosphatidylcholines, and ceramides. *J Proteome Res.*, v.7, n.10, p.4266-4277, 2008.
- SHIMIZU, T. Lipid Mediators in Health and Disease: Enzymes and Receptors as Therapeutic Targets for the Regulation of Immunity and Inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v.49, p.123-150, 2009.

SILVA, I.C.C (2009). Uso de processos combinados para aumento do rendimento da extração e da qualidade do óleo de macaúba. [Dissertação de Mestrado].

SILVA, J. C. Macaúba: fonte de matéria-prima para os setores alimentício, energético e industrial. Viçosa, 1994, 41 f. Trabalho de conclusão da disciplina Cultivo de Essências Exóticas e Nativas. Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa.

SIQUEIRA, E.M.A.; ARRUDA, S.F.; VARGAS, R.M.; SOUZA, E.M. β -Carotene from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaves improves vitamin A status in rats. Comparative Biochemistry and Physiology. C: Toxic Pharmacol., v.146, p.235-240, 2007.

SKAJAA, T.; CORMODE, D.P.; FALK, E.; MULDER, W.J.; FISHER, E.A.; FAYAD, Z.A. High-density lipoprotein-based contrast agents for multimodal imaging of atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol., v.30, n.2, p.169-176, 2010.

SBC, 2007. Sociedade brasileira de cardiologia. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arq. Bras. Cardiol. volume 88, suplemento I, Abr/2007.

SOMERVILLE, C.; BROWSE, J.; JAWORSKI, J.G.; OHIROGGE, J.B. Lipids in: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. Biochem. Mol. Biol. Plants., p.456-527, 2000.

SPARKS, D.L.; CHATTERJEE, C.; YOUNG, E.; RENWICK, J.; PANDEY, N.R. Lipoprotein charge and vascular lipid metabolism. Chem Phys Lipids., v.154, n.1, p.1-6, 2008.

STRYER, L.; BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L. *Bioquímica*. 6ª edição, Editora Guanabara Koogan, 2008.

SUPERKO, H.R. Advanced lipoprotein testing and subfractionation are clinically useful. Circulation., v.119, p.2383-2395, 2009.

TEIXEIRA, E. *Acrocomia aculeata* In: TASSARO, H. Frutas no Brasil. São Paulo: Empresa das Artes, 1996, p.15.

TEIXEIRA, L.C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. Informe Agropecuário, v.26, p.18-27, 2005.

THOMAS, T.R.; ZIOGAS, G.; HARRIS, W.S. Influence of fitness status on very-low-density lipoprotein subfractions and lipoprotein(a) in men and woman. Metabolism, v.46, n.10, p.1178-1183, 1997.

TOMASZEWSKI, M.; CHARCHAR, F.J.; BARNES, T.; GAWRON-KISZKA, M.; SEDKOWSKA, A.; PODOLECKA, E.; KOWALCZYK, J.; RATHBONE, W.; KALARUS, Z.; GRZESZCZAK, W.; GOODALL, A.H.; SAMANI, N.J.; ZUKOWSKA-SZCZUCHOWSKA, E. A common variant in low-density lipoprotein receptor-related protein 6 gene (LRP6) is associated with LDL-cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v.29, n.9, p.1316-1321, 2009.

TRIPOLI, E.; GIAMMANCO, M.; TABACCCHI, G.; DI MAJO, D.; GIAMMANCO, S.; LA GUARDIA, M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev.*, v.18, p.98-112, 2005.

URIOSTE, D. Produção de biodiesel por catálise enzimática do óleo de babaçu com alcoóis de cadeia curta. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Lorena (2004).

VECCHIO, S.; CAMPANELLA, L.; NUCCILLI, A.; TOMASSETTI, M. Kinetic study of thermal breakdown of triglycerides contained in extra-virgin olive oil. *J Therm Anal Calorim.*, v.91, p.51-56, 2008.

VISOLI, F.; GALLI, C. Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, v.42, p.209-221, 2002.

VOET, D.; VOET, G.J.; PRATT, C.W. Fundamentos de Bioquímica, trad. Fett Neto, A.G. Artmed Editora: Porto Alegre, 2000.

YOUSSEF, E. A. A.; HUSSAIN, A. E.; SHOEB, Z. E. *J Sci. Ind. Res. Índia* 60 (2001) 383.

WALLIS, J.G.; WATTS, J.L.; BROWSE, J. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends Biochem Sci.*, v.27, p. 467, 2002.

WHITE, B. Dietary Fatty Acids. *Amer Fam Phys.*, v.80, n.4, p.345-350, 2009.

WOODSIDE, J.V.; MCKINLEY, M.C.; YOUNG, I.S. Saturated and trans fatty acids and coronary heart disease. *Curr Atherosc Rep.*, v.10, n.6, p.460-466, 2008.

ZERN, T.L.; FERNANDEZ, M.L. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J Nutr.*, v.135, p.2291-2294, 2005.

CAPÍTULO 2

Artigo elaborado de acordo com as normas da revista Biochimie
(<http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>)

Caracterização do Óleo da Polpa de Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) e Azeite de Oliva (*Olea europaea* L.) Virgem Extra e Seus Efeitos Sobre Dislipidemia e Outros Parâmetros Sanguíneos, Tecido Hepático, Parâmetros Corporais e Mutagênese Em Ratos *Wistar*

Marcio Aoqui ^{a,*}, Gabielly Ciconini^a, Brunna Mary Okubo ^b, Danieli Fernanda Buccini ^b, Márcia Maria Silva^c, Susana Elisa Moreno ^b, Simone Palma Favaro ^a

^a Laboratório de Biotecnologia de Materias Primas, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande-MS

^b Laboratório de Farmacologia e Mutagênese, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande-MS

^c Laboratório de Patologia Clínica da Ultramedical Centro de Diagnósticos em Medicina, Campo Grande-MS

* Correspondência: Márcio Aoqui Endereço de e-mail: nikkenobjetivo@hotmail.com.

RESUMO: Este estudo teve como objetivo caracterizar físico-quimicamente o óleo da polpa de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) e o azeite de oliva (*Olea europaea* L.) virgem extra e avaliar o efeito sobre dislipidemias e outros parâmetros sanguíneos, tecido hepático, parâmetros corporais e mutagênese em ratos *Wistar*. Foram realizados dois experimentos para responder às seguintes questões: 1. Qual o efeito destes óleos em dieta hipercolesterolêmica continuada? e 2. Qual o efeito destes óleos quando se substitui dietas dislipidêmicas por dieta normal? Quanto à composição os óleos apresentaram similaridade na proporção de ácido oleico, em torno de 60%, e qualidade adequada para consumo humano. Os óleos de macaúba e oliva não reverteram o quadro dislipidêmico quando administrados concomitantemente à alimentação com ração hipercolesterolêmica ou em substituição por ração padrão em ratos no prazo avaliado. No entanto, pode-se observar uma tendência de redução da taxa de colesterol total, LDL-colesterol e glicemia nos animais suplementados com óleo de macaúba e oliva. A suplementação com óleo de macaúba não elevou os triglicerídeos e a glicemia. O óleo de macaúba, administrado concomitante a ração padrão após a indução a hipercolesterolemia, levou a menor ganho de peso. Não se observou ação mutagênica do óleo de macaúba. Todos os animais que receberam alimentação com ração hipercolesterolêmica, independentemente da suplementação com os óleos de oliva ou macaúba, sofreram alteração no tecido hepático. O óleo de macaúba pode ser considerado seguro para o consumo humano, uma vez que, de maneira geral apresentou efeito similar ao azeite de oliva.

Palavras-Chave: Ácido oléico, hipercolesterolemia, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicerídeos e palmácea.

1. Introdução

A macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) é uma espécie de palmeira com ampla distribuição geográfica. Ocorre praticamente em todo o continente [1, 2, 3].

No Brasil ocorrem povoamentos naturais em quase todo território, mas as maiores concentrações estão localizadas em Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, sendo amplamente espalhados pelas áreas de Cerrado [4, 1].

Um dos principais aspectos para a utilização da macaúba é a produção de óleos. Os frutos são altamente produtivos e podem gerar de 1500 a 5000 kg de óleo por hectare por ano [5].

Do fruto da macaúba são extraídos dois tipos de óleos. Da amêndoa, é um óleo fino e transparente, rico em ácido láurico e oléico, tendo potencial para utilizações na indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. Da polpa, é extraído um óleo de cor vermelho amarelado, rico em ácido oléico, palmítico, carotenóides e tocoferóis e tem boas características para o processamento industrial [6].

HIANE e colaboradores [7], reportaram teor de ácidos graxos monoinsaturados no óleo da polpa de macaúba de 66,9%, com predominância de ácido oléico. A elevada proporção de ácido oléico presente no óleo da polpa de macaúba, próximo ao encontrado em azeite de oliva virgem extra, levanta a hipótese de ação biológica similar sobre o metabolismo lipídico.

O ácido oléico é um ácido graxo monoinsaturado que apresenta na sua composição química 18 átomos de carbonos e apenas uma insaturação. Esta configuração molecular lhe confere características importantes. Reduz sensivelmente a síntese de lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol), que é a principal formadora da placa aterogênica nos vasos sanguíneos e, concomitantemente, aumenta os níveis da lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), que transporta o colesterol livre dos tecidos e sangue para o fígado, para ser metabolizado e excretado pelo organismo [8, 9]. Portanto, está associado a menor incidência de infarto ou acidente vascular cerebral ou periférico.

A dislipidemia está associada ao processo de aterosclerose. Estudos epidemiológicos mostram que o colesterol total juntamente com o aumento de LDL associados com alguns fatores de risco como cigarro, hipertensão, stress, histórico familiar, sedentarismo, diabetes, triglicérides alto, obesidade, uso de inibidores de proteases e o uso de drogas [52], torna-se um dos principais indicadores de risco cardiovascular [10].

A ingestão de maior proporção de ácidos graxos monoinsaturados e compostos antioxidantes, pode reduzir fatores de risco e a susceptibilidade da parede vascular no desencadeamento de eventos pró-inflamatórios e pró-aterogênico [14].

Até o momento não há informações consistentes sobre os efeitos do óleo da polpa de macaúba sobre o metabolismo animal.

Este conhecimento é fundamental para se estabelecer diretrizes para a produção e consumo deste óleo.

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito do consumo do óleo da polpa de macaúba sobre parâmetros sanguíneos, mutagenicidade, danos hepáticos e ganho de peso em ratos induzidos à hipercolesterolemia.

2. Material e Métodos

2.1. Animais utilizados no experimento

Foram utilizados ratos machos, da espécie *Ratus norvegicus*, linhagem *Wistar* de aproximadamente 21 dias de idade e 80 a 150 g de massa corporal. Os procedimentos de manejo com os animais seguiram o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* [15]. O experimento com animais teve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), protocolo nº 005/11, de 16 de novembro de 2011.

2.2. Rações

A ração padrão utilizada nos experimentos foi da marca Nuvilab® (Nuvilab CR-1) para ratos e camundongos, lote número 0026051108. A formulação é composta de milho integral moído, farelo de soja e farelo de trigo. A composição química está descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Composição química da ração padrão para ratos e camundongos*.

Produto	Concentração
Umidade (max.)	12,5 g. 100 g ⁻¹
Proteína bruta (min.)	22,0 g. 100 g ⁻¹
Extrato Etéreo (min.)	4,0 g. 100 g ⁻¹
Matéria Mineral (max.)	9,0 g. 100 g ⁻¹
Matéria Fibrosa (max.)	7,0 g. 100 g ⁻¹
Cálcio (min. – max.)	1,0 a 1,4 g. 100 g ⁻¹
Fósforo (min.)	0,8 g.100 g ⁻¹
Vitamina A (min.)	1300 UI.100 g ⁻¹
Vitamina D3 (min.)	200 UI.100 g ⁻¹
Vitamina E (min.)	3,4 UI.100 g ⁻¹
Vitamina K3 (min.)	0,33 mg.100 g ⁻¹
Vitamina B1 (min.)	0,5 mg.100 g ⁻¹
Vitamina B2 (min.)	0,6 mg.100 g ⁻¹
Vitamina B6 (min.)	0,7 mg.100 g ⁻¹
Vitamina B12 (min.)	2,2 mcg.100 g ⁻¹
Niacina (min.)	6,0 mg.100 g ⁻¹
Ácido Pantotênico (min.)	2,0 mg.100 g ⁻¹
Ácido Fólico (min.)	0,1 mg.100 g ⁻¹
Biotina (min.)	0,005 mg.100 g ⁻¹
Colina (min.)	100 mg.100 g ⁻¹
Sódio (min.)	27,0 mg.100 g ⁻¹
Ferro (min.)	5,0 mg.100 g ⁻¹
Manganês (min.)	6,0 mg.100 g ⁻¹
Zinco (min.)	6,0 mg.100 g ⁻¹
Cobre (min.)	1,0 mg.100 g ⁻¹
Iodo (min.)	0,2 mg.100 g ⁻¹
Selênio (min.)	0,005 mg.100 g ⁻¹
Cobalto (min.)	0,15 mg.100 g ⁻¹
Flúor (máx.)	8,0 mg.100 g ⁻¹
Lísina (min.)	1,2 g.100 g ⁻¹
Metionina (min.)	400 mg.100 g ⁻¹

* descrição de acordo com fabricante.

A ração hipercolesterolêmica foi desenvolvida pela empresa PRAGSOLUÇÕES-BIOCIÊNCIAS e contém como agentes promotores da hiperlipidemia o colesterol e ácido cólico, além de ácidos graxos saturados em elevada proporção (Tabela 2).

Tabela 2. Composição química da ração hipercolesterolêmica para ratos e camundongos*.

Produto	Concentração (g. 100 g⁻¹)
Amido de milho	25,25
Caseína	20,00
Amido dextrinizado	13,20
Sacarose	10,00
Gordura hidrogenada	20,00
Celulose microcristalina	5,00
Mix mineral AIN 93 G	3,50
Mix vit. AIN 93	1,00
L cistina	0,30
BHT	0,0014
Ácido cólico	0,50
Colesterol	1,00
Bitartarato de colina	0,25
Total	100

* descrição de acordo com fabricante.

O aspecto geral das rações padrão e hiperlipidêmica pode ser observado na Figura 1.



Figura 1. Ração hipercolesterolêmica para ratos e camundongos (A) e ração padrão para ratos e camundongos (B).

2.3. Óleos

O óleo da polpa de macaúba (Figura 2) foi extraído de frutos maduros coletados de diversas plantas situadas no município de Rochedo – MS (Latitude -19° 57' 11", Longitude -54° 53' 33", altitude de 260 metros), em meados dos meses de janeiro e fevereiro de 2011. Os frutos foram secos em estufa (marca Tecnal, modelo TE397/3) a 80 °C por seis horas para facilitar o despulpamento, o qual foi realizado

mecanicamente. O óleo da polpa foi extraído por prensa tipo expeller (marca ECIRTEC, modelo MPE – 40), Após a extração, o óleo de macaúba foi centrifugado a 3900 rpm/15 min. A fração de sólidos foi desprezada e o óleo porcionado em frascos de 100 mL. Nitrogênio foi borbulhado no óleo para promover uma atmosfera inerte e assegurar estabilidade oxidativa. O óleo foi mantido a -18 °C (Nitrogênio) até sua utilização.

O azeite de oliva virgem extra, utilizado no experimento, foi da marca Cocinero®, lote número 0111.0820.08R-1, adquirido no comércio local. A escolha da marca foi aleatória, estabelecendo apenas o critério da sua classificação como virgem extra.



Figura 2. Óleo da polpa de macaúba. Fonte: Foto cedida por Gabrilly Ciconini.

2.4. Caracterização físico-química do óleo da polpa de macaúba e do azeite de oliva virgem extra

Os óleos da polpa de macaúba, oliva e aqueles extraídos das rações foram caracterizados. Todas as análises foram feitas em quintuplicatas, com exceção da cromatografia gasosa realizada em duplicata.

2.4.1. Índices de acidez, peróxido e iodo

O índice de acidez (AOCS, 1995) foi realizado segundo o método Ca5a-40) e o índice de peróxido (AOCS, 1993) pelo método Cd8-53 [18, 16] e expressos em % de ácido oléico e mEq O₂/Kg de óleo, respectivamente. Segundo, a RDC 270 [17], a

acidez máxima para azeite de oliva virgem extra deve ser de 0,8% expressa em ácido oléico e o índice de peróxidos deve estar abaixo de 20 mEq O₂/Kg.

O índice de iodo (AOCS, 1995) [18] segundo o método Cd 1-25, foi determinado diretamente da composição de ácidos graxos insaturados obtidos a partir da análise por cromatografia em fase gasosa [18]. O valor expresso baseia-se na média dos índices de iodo dos triglicerídeos e dos ácidos graxos livres, calculados de acordo com as equações 1 e 2.

Equação 1. Índice de iodo dos triglicerídeos

$$(\% \text{ ácido palmitoléico} \times 0,950) + (\% \text{ ácido oléico} \times 0,860) + (\% \text{ ácido linoléico} \times 1,732) + (\% \text{ ácido linolênico} \times 2,616) + (\% \text{ ácido gadoléico} \times 0,785) + (\% \text{ ácido erúcido} \times 0,723) = \text{Índice de iodo dos triglicerídios.}$$

Equação 2. Índice de iodo dos ácidos graxos livres

$$(\% \text{ ácido palmitoléico} \times 0,990) + (\% \text{ ácido oléico} \times 0,8986) + (\% \text{ ácido linoléico} \times 1,810) + (\% \text{ ácido linolênico} \times 2,735) + (\% \text{ ácido gadoléico} \times 0,8175) + (\% \text{ ácido erúcido} \times 0,7497) = \text{Índice de iodo dos ácidos graxos livres.}$$

2.4.2. Absortividade Molar

A absortividade molar é uma medida espectrofotométrica na região do ultravioleta (UV) que fornece informações sobre a qualidade de um óleo, seu estado de conservação e alterações causadas pelo processamento. Os compostos primários de degradação dos óleos têm absorção máxima de luz no comprimento de onda a 232 nm, e os compostos secundários absorvem luz a 270 nm [19]. Os produtos da oxidação foram quantificados pelo método espectrofotométrico NDG C – 40 [20]. Foi utilizado para a leitura espectrofotômetro (marca Aquamate V. 4,55, modelo Thermo Spectronic) com cubetas de quartzo.

2.4.3. Carotenóides totais

Para a quantificação de carotenóides totais as amostras de óleo foram solubilizadas em éter de petróleo e absorvância registrada a 450 nm em espectrofotômetro (marca Aquamate, modelo V. 4,55, modelo Thermo Spectronic) com cubetas de quartzo [21]. A concentração de carotenóides totais foi calculada de acordo com a equação 3:

$$\text{Carotenóides totais } (\mu\text{g/g}) = \frac{A \times V \text{ (ml)} \times 10^4}{A_{1\text{cm}}^{1\%} (\beta - \text{caroteno}) \times \text{amostra (g)}}$$

Equação 3. Cálculo de carotenóides totais

Onde:

A = Absorvância da amostra

V= Volume de diluição da amostra no solvente

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = Coeficiente de extinção do β - caroteno a 450 nm em éter de petróleo

2.5. Análise do perfil de ácidos graxos

2.5.1. Extração da fração lipídica das rações padrão e hipercolesterolêmica

A extração da fração lipídica das rações padrão e hipercolesterolêmica foi realizada através de extrator Soxhlet utilizando como solvente o hexano [16]. Após a extração, as frações lipídicas das rações foram conservadas congeladas a -18 °C (atmosfera de Nitrogênio) até sua utilização.

O perfil de ácidos graxos do óleo da polpa de macaúba, azeite de oliva virgem extra e da fração lipídica das rações padrão e hipercolesterolêmica foi determinado por cromatografia em fase gasosa.

As amostras foram metiladas utilizando como catalisador trifluoreto de boro (BF₃) [16] para que ocorra a reação de transesterificação, formando ésteres metílicos de ácidos graxos.

Foi utilizado cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (marca Agilent Technologies, modelo 6890 N Network 6 C System, série US

10337027 (Made in USA). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram avaliados sob as seguintes condições: temperatura do injetor de 225 °C; temperatura do detector de 285 °C; temperatura da coluna (HP-88 10,0m x 0,250 mm) de 160 °C inicial por 3 minutos, rampa de 3 °C/min até 190 °C por 6 minutos e rampa de 6 °C/min até temperatura final de 230 °C por 12 minutos. O tempo total da corrida foi de 37,67 minutos, razão de split 100:1, fluxo de gás hidrogênio 40 mL/min, fluxo de ar sintético 450 mL/min, fluxo de gás hélio 40 mL/min, volume de injeção 1 µL. A identificação dos ácidos graxos foi realizada através da comparação do tempo relativo dos picos existentes na amostra com o tempo relativo dos ésteres metílicos de ácidos graxos de padrão mix (C8-C22, Supelco). O tempo de retenção relativo foi obtido com o padrão interno Undecanoato de Metila. A proporção dos ésteres metílicos foi determinada através da integração das áreas dos picos.

2.6. Índice de qualidade nutricional (índices de aterogenicidade, índice de trombogenicidade e razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos/hipercolesterolêmicos) do óleo da polpa de macaúba, azeite de oliva virgem extra e frações lipídicas das rações padrão e hipercolesterolêmica.

A alimentação do ser humano contém inúmeros compostos que estão diretamente relacionados com o aumento, diminuição e até mesmo com a incidência de algumas doenças. Dentre esses compostos estão alguns ácidos graxos que possuem a capacidade de promover ou prevenir a aterosclerose e a trombose com base em seus efeitos sobre o colesterol sérico [22].

Para avaliar a qualidade nutricional dos lipídeos, Ulbricht e Southgate [23] propuseram os índices de aterogenicidade (IA), trombogenicidade (IT) e a razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos. As proporções dos ácidos graxos utilizados nos cálculos foram obtidas por cromatografia em fase gasosa. Para a determinação do índice de aterogenicidade (Equação 4), apenas os ácidos graxos saturados com cadeia entre 12 a 16 carbonos são mais aterogênicos, sendo o ácido mirístico considerado quatro vezes mais aterogênico do que o ácido láurico e o ácido palmítico. O ácido esteárico, saturado, é omitido em função de não interferir na colesterolemia. Todos os ácidos graxos insaturados são potencialmente hipocolesterolêmicos [22, 23].

$$IA = \frac{[(C\ 12:0 + (4 \times C\ 14:0) + C\ 16:0)]}{(\Sigma\ AGMI + \Sigma\ \omega 6 + \Sigma\ \omega 3)}$$

Equação 4. Cálculo do índice de aterogenicidade

Onde:

IA= Índice de Aterogenicidade

AGMI= Ácidos Graxos Monoinsaturados

Para definir o índice de trombogenicidade (Equação 5), os ácidos mirísticos, palmítico e esteárico são considerados pró-trombogênicos, enquanto os ácidos graxos insaturados são anti-trombogênicos com diferentes potencialidades [23, 24].

$$IT = \frac{(C\ 14:0 + C\ 16:0 + C\ 18:0)}{[(0,5 \times \Sigma\ AGMI) + (0,5 \times \Sigma\ \omega 6 + (3 \times \Sigma\ \omega 3) + \left(\frac{\Sigma\ \omega 3}{\Sigma\ \omega 6}\right)]}$$

Equação 5. Cálculo do índice de trombogenicidade

Onde:

IT= Índice de Trombogenicidade

AGMI=Ácidos Graxos Monoinsaturados

A razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos (H/H) (Equação 6) é outro parâmetro de avaliação nutricional dos lipídeos. Este índice está relacionado com a atividade funcional dos ácidos graxos em relação ao metabolismo do colesterol. A quantificação reflete o maior ou menor risco de incidência de doenças cardiovasculares [25, 26]. Essa razão considera os ácidos graxos insaturados (oléico, linoléico, araquidônico, linolênico, EPA, DPA, DHA) como potencialmente hipocolesterolêmicos e os ácidos graxos saturados (mirístico e palmítico) como hipercolesterolêmicos. Quanto maior o índice H/H, mais elevado é o teor de ácidos graxos hipocolesterolêmicos, sendo mais adequado nutricionalmente [25, 27].

$$HH = \frac{(C18:1\ cis9 + C18:2\omega6 + C20:4\omega6 + C18:3\omega3 + C20:5\omega3 + C22:5\omega3 + C22:6\omega3)}{(C14:0 + C16:0)}$$

Equação 6. Razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos

Onde:

H/H = Razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos

2.7. Experimentos *in vivo*

Segundo recomendações de Paiva e colaboradores [28], os animais foram mantidos em local adequado e alojados em caixas retangulares grandes de polipropileno. Cada caixa comportou oito ratos, perfazendo um grupo de pesquisa. Antes do início do experimento, os animais passaram por um período de adaptação de 3 dias e nesta fase, foram alimentados com ração padrão e ofertada água *Ad libitum*. Os ratos *Wistar* foram divididos em 7 grupos com 8 animais por grupo, perfazendo um total de 56 animais. A divisão foi estabelecida de acordo com a alimentação administrada e a suplementação recebida com o óleo da polpa de macaúba ou óleo de oliva virgem extra. Os exames laboratoriais foram realizados nos materiais biológicos como sangue e fígado.

2.7.1. Experimento *in vivo* 1 - Ração hipercolesterolêmica por 14 dias e suplementação com óleos

No experimento 1 os ratos foram alimentados continuamente por 14 dias com ração hipercolesterolêmica e a partir do sétimo dia suplementados com óleo de oliva ou macaúba. Os grupos componentes deste experimento foram:

- **Grupo N14** – Controle normal - Animais alimentados com ração padrão por 14 dias.
- **Grupo H14** – Controle hiperlipidêmico - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias.
- **Grupo H14O7** – Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias, nos últimos 7 dias, suplementação com azeite de oliva virgem extra.
- **Grupo H14M7** – Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias, nos últimos 7 dias, suplementação com óleo da polpa de macaúba.

2.7.2. Experimento *in vivo* 2 - Ração hipercolesterolêmica por 7 dias seguida de substituição por ração padrão e suplementação com óleos

No experimento 2 os ratos foram alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguida de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementação com óleo da polpa de macaúba ou de oliva.

- **Grupo H7N7** – Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias.
- **Grupo H7O7**– Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias, suplementados com azeite de oliva virgem extra nos 7 dias finais.
- **Grupo H7M7** – Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias, suplementados com óleo da polpa de macaúba nos 7 dias finais.

A administração dos óleos nos animais foi realizada pelo método de gavagem. Foi utilizado um tubo esofágico, flexível com agulha de ponta arredondada. O tubo foi introduzido na boca do animal assegurando que não penetrasse a traquéia para não perfurá-la. O extravasamento do óleo no interior dessa cavidade poderia levar o animal a óbito [28]. Foi administrado individualmente um volume de 1 mL/kg de peso do animal/dia [29].

Ao final do experimento, os animais foram deixados em jejum por 12 horas. A finalidade do jejum foi a obtenção de um soro mais límpido, livre dos quilomícrons oriundos da digestão. A turvação do soro interfere nas dosagens laboratoriais. Após o jejum, os animais foram eutanasiados. Primeiramente, foram colocados em uma câmara de CO₂ (câmara de vidro com tubos condutores, interligados a cilindros de gases de CO₂), provocando analgesia profunda. Em seguida, foi realizado o deslocamento cervical provocando uma morte rápida. Estes procedimentos seguem os preceitos das normas do Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) da UCDB. O sangue, fígado e a gordura visceral de cada animal, foram retirados e identificados por grupo e individualmente e armazenados adequadamente.

2.8. Análises Bioquímicas

O sangue total foi retirado por punção intra-cardíaca de cada animal (Figura 3). Em seguida foi separado o soro em centrífuga (marca Hermle Labortechnik GmbH, modelo Z 326 K) e armazenado congelado em freezer até sua utilização. Esse material foi utilizado nas dosagens bioquímicas. A metodologia seguiu o Procedimento Operacional Padrão (POP) da empresa Labtest Diagnóstica S.A. Foram utilizados aparelhos automatizados nas dosagens bioquímicas (marca Labtest Diagnóstica, modelo Labmax 240; marca Bayer Diagnóstica, modelo Express Plus). Para as dosagens dos eletrólitos sanguíneos foi utilizado o aparelho de eletrodo íon seletivo (marca AVL Medical Instruments AG (Suíça), modelo AVL 9180). Foram realizados os exames do Perfil Lipídico [Colesterol Total (CT), HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol e Triglicérides (TGs)]; Perfil Hepático [Bilirrubina Total (BT), Bilirrubina Direta (BD), Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), Fosfatase Alcalina (FA) e Gama Glutamil Transferase (GGT)]; Glicemia (GLI); Perfil Renal [(Uréia (UR) e Creatinina (CRE)]; Eletrólitos [Sódio (Na^+), Potássio (K^+) e Cloretos (Cl^-)].

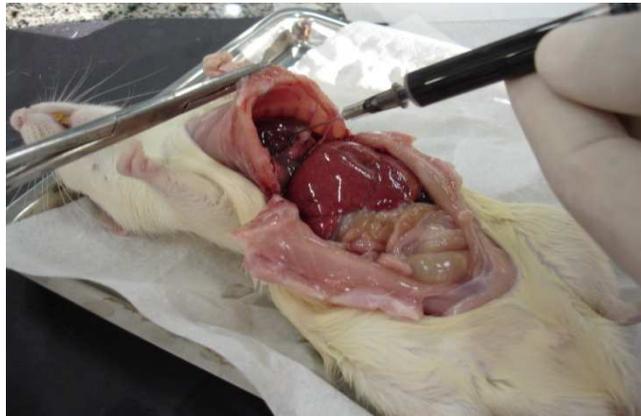


Figura 3. Punção intra-cardíaca em ratos *Wistar* macho.

2.9. Avaliação Anatomopatológica de Fígado

Após a coleta, os fígados dos ratos *Wistar* foram identificados e conservados em formol a 10%. Os materiais foram encaminhados ao laboratório de patologia clínica da empresa Ultramedical (Centro de Diagnóstico em Medicina), em Campo Grande – MS, para análise. A metodologia de preparação das lâminas de

microscopia seguiu a técnica do autor Junqueira e Carneiro [30] e coloração por hematoxilina e eosina. Para leitura das lâminas foi utilizado microscópio óptico (marca Nikon, modelo Eclipse E 200). A visualização de alterações citoplasmáticas e nucleares, com presença de vacúolos citoplasmáticos é indicativo de acúmulo de gordura com ou sem dano celular, indicando esteatose hepática.

2.10. Tecido Adiposo Visceral

Após a dissecação dos animais, todo tecido adiposo visceral acumulado foi retirado (Figura 4). Executou-se a pesagem em balança eletrônica (marca Gehak, modelo BG 400), para a verificação do percentual de ganho no período compreendido entre o início e fim do experimento. Os animais também foram pesados no início e no fim do experimento.



Figura 4. Tecido adiposo visceral retirado de rato *Wistar* macho.

2.11. Mutagênese

Atualmente uma das metodologias utilizadas para avaliar danos causados por substâncias xenobióticas nos organismos é o Teste do Micronúcleo (MN). É caracterizado por sua capacidade de detectar agentes clastogênicos (quebra de cromossomos), e de agentes aneugênicos (segregação cromossômica anormal) requerendo, no entanto, proliferação celular para a observação do biomarcador de efeito. O teste de micronúcleo foi realizado a partir de esfregaços de sangue total de ratos *Wistar* submetidos a teste experimentais. O sangue colhido foi gotejado sobre uma lâmina para ser realizado o esfregaço, com secagem do material por 12 horas e coloração com Giemsa. Para a avaliação do potencial genotóxico a frequência de micronúcleos em eritrócitos (Figura 5), foi avaliada pela contagem de

2000 células por animal, conforme Heddle, 1991 [31]. A confecção das lâminas e a contagem foram realizadas pelo procedimento duplo-cego, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse E-200) em objetiva de imersão (10x100).

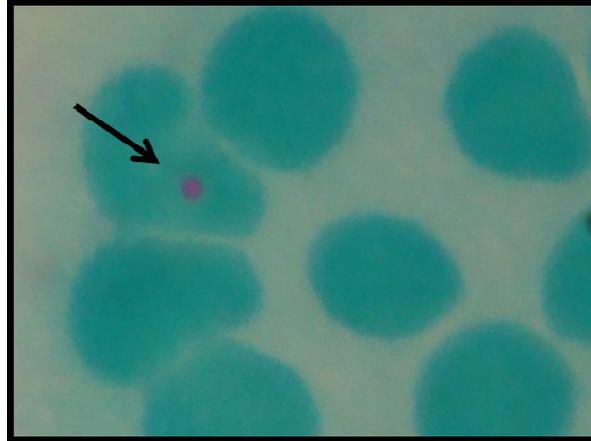


Figura 5: Eritrócitos micronucleados. Fonte: Foto cedida por Brunna Mary Okubo.

3. Resultados

3.1. Caracterização do óleo da polpa de macaúba e do azeite de oliva virgem extra.

Segundo a legislação brasileira, sob a Instrução Normativa número 166, publicada no Diário Oficial da União em 30 de Agosto de 2010 [59] e a RDC 270 [17], a acidez máxima para azeite de oliva virgem extra deve ser 0,8% expressa em ácido oléico. O azeite de oliva virgem extra e o óleo da polpa de macaúba utilizados no experimento apresentaram acidez (Tabela 3) acima dos parâmetros aceitáveis. A acidez, segundo a AOCS [16], é um parâmetro relacionado intimamente à qualidade e o grau de pureza do óleo, como a natureza e a qualidade da matéria-prima e seu processamento e principalmente, com as condições de conservação. Estas condições estão relacionadas à acidez livre, decorrente da hidrólise parcial dos glicerídeos [32], motivada por aquecimento e luz. Atualmente não existem normas específicas para a caracterização físico-química em óleo da polpa de macaúba. Toda a caracterização realizada nesse óleo teve como parâmetro os índices do padrão oficial para azeite de oliva vigente na legislação brasileira através da Instrução Normativa número 166, publicada no Diário Oficial da União em 30 de

Agosto de 2010 [59]. A elevada acidez presente no óleo da polpa de macaúba provavelmente está relacionada ao processo pelo qual o fruto foi submetido. Para facilitar o despulpamento e prensagem os frutos foram secos a 80 °C por seis horas. A temperatura alta pode ter promovido a hidrólise dos triglicerídeos. Hiane e colaboradores [7] encontraram em seus trabalhos acidez de 0,83% no óleo da polpa de macaúba, mostrando excelente qualidade intrínseca. Segundo os autores, o processo de pós-colheita e extração da polpa pode ser considerado o principal fator para a transformação do produto, diminuindo sua qualidade. Para a indústria alimentícia e farmacêutica, a elevada acidez compromete a qualidade final do óleo, pois provoca profunda modificação da fração lipídica, proporcionando alterações nutricionais e sensoriais [60]. O óleo da polpa de macaúba caracterizou-se por elevada quantidade de ácido graxo monoinsaturado oléico, atendendo à atual demanda por óleos com características nutricionais adequadas e à premissa industrial por estabilidade oxidativa conferida por esse ácido graxo. Para o azeite de oliva virgem extra, adquirido no comércio local, o índice de acidez discriminado no rótulo era de 0,8%. Esta alteração pode ser resultado de fatores como a exposição à luz e calor durante o armazenamento.

A tabela 3 mostra os resultados da caracterização físico-química do óleo da polpa de macaúba e do azeite de oliva virgem extra.

Tabela 3. Caracterização físico-química de óleo da polpa de macaúba e azeite de oliva virgem extra.

Parâmetro de qualidade	Óleo de polpa de macaúba	Azeite de oliva virgem extra	Legislação Brasileira (IN nº 166)
Acidez livre (% de ácido oléico)	6,28 ± 0,05	1,19 ± 0,05	≤ 0,8
Índice de peróxido (mEq de O ₂ /Kg)	0,64 ± 0,20	2,74 ± 0,09	≤ 20
Índice de iodo (g I ₂ /100g)	64,59 ± 0	80,92 ± 0	75 a 94
Extinção específica no ultravioleta ou Absortividade Molar (232 nm)	1,16 ± 0,02	1,55 ± 0,03	≤ 2,50
Extinção específica no ultravioleta ou Absortividade Molar (270 nm)	0,22 ± 0,02	0,62 ± 0,01	≤ 0,22
Carotenóides (µg/g)	256,05 ± 4,90	0 ± 0	-

Média±desvio Padrão.

IN = Instrução Normativa nº 166. Diário Oficial da União, seção 1, 30 de agosto de 2010.

O índice de peróxido para o azeite de oliva virgem extra deve estar abaixo de 20 mEq/Kg segundo a Instrução Normativa número 166, publicada no Diário Oficial da União em 30 de Agosto de 2010 [59] e a RDC 270 [17]. Portanto, em relação à presença de compostos de degradação por via oxidativa [16], o óleo da polpa de macaúba e o azeite de oliva estão dentro do limite permitido.

O índice de iodo mede o grau de insaturação dos óleos [16], Quanto maior a insaturação do ácido graxo, maior será a absorção de iodo [32, 61].

Nos óleos avaliados, o azeite de oliva apresentou o índice de iodo superior ao óleo da polpa de macaúba, sendo mais insaturado (tabela 3). Apesar de existir uma diferença no valor do índice de iodo, existe uma similaridade no perfil de ácidos graxos, principalmente na concentração de ácido oléico (Tabela 4).

A absorvidade molar, SILVA e colaboradores [19], ou extinção específica no ultravioleta, é uma propriedade de identidade e qualidade do óleo e mostra que na fase inicial do processo de oxidação dos óleos, a degradação dos ácidos graxos polinsaturados leva a formação de peróxidos e hidroperóxidos (dienos conjugados) que são compostos primários da degradação lipídica. Secundariamente a este processo ocorre a formação das α -dicetonas ou cetonas insaturadas, trienos e aldeídos [33, 34]. Os compostos primários têm absorção máxima de luz no comprimento de onda em 232 nm e os secundários em 270 nm. Para o azeite de oliva virgem extra a legislação brasileira tolera valores de até 2,50 (232 nm) e 0,22 (270 nm) [59, 17]. Para o óleo da polpa de macaúba não existem normas específicas e foram utilizados o padrão oficial vigente para o azeite de oliva.

O óleo de macaúba e o azeite de oliva utilizados neste trabalho apresentaram absorvidades em 232 nm dentro do limite recomendado pela legislação brasileira. Para a absorvidade em 270 nm o óleo de macaúba apresentou leitura dentro dos limites recomendados e o azeite de oliva, leitura acima do recomendado pela legislação brasileira. Em estudos realizados por PEIXOTO e colaboradores [35], avaliaram os índices de identidade e qualidade do azeite de oliva e compará-los com a Resolução número 22/77/MS, CODEX ALIMENTARIUS e União Européia e propor uma atualização da legislação brasileira. Foram avaliadas vinte amostras de dez marcas diferentes nacionais e importadas. As marcas nacionais apresentaram absorvidade em 232 e 270 nm compatíveis com os padrões internacionais. O azeite de oliva utilizado em nosso trabalho apresentou absorvidade em 232nm compatível

com o padrão oficial utilizado pela legislação brasileira, mas em comprimento de onda em 270 nm estava acima do proposto pela legislação brasileira. O índice de acidez variou de 0,15 a 0,75% em ácido oléico e o índice de iodo variou de 85,88 a 127,46 g I₂/100g, com 66% de amostras reprovadas. Observaram que todas as amostras nacionais apresentaram um elevado teor de transoléico (6,6-15,5), indicativo de adulteração com óleos hidrogenados e a composição em ácidos graxos mostrou provável adulteração com óleo de soja. As amostras importadas apresentaram os índices de identidade e qualidade dentro dos padrões internacionais.

Os carotenóides na saúde humana têm sua importância relacionada com a atividade pró-vitáminica A e propriedades antioxidantes. Existem mais de 600 tipos de carotenóides isolados e caracterizados a partir de fontes naturais. Na polpa de macaúba são responsáveis pela coloração laranja [11] é o β -caroteno, representa aproximadamente 82% do total de carotenóides [12]. Os carotenóides são antioxidantes naturais que garantem estabilidade oxidativa aos óleos vegetais [13]. A atividade antioxidante desses componentes também está diretamente relacionada com a melhora da resposta imune, redução no risco de doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata e degeneração macular e doenças cardiovasculares [36, 21].

O óleo da polpa de macaúba (Tabela 3) apresentou 256,09 $\mu\text{g/g}$ de carotenóides totais enquanto no azeite de oliva não foi detectada a presença destas moléculas. O azeite de oliva comercial passa por processos de industrialização (purificação e refino) e provavelmente todo o carotenóide existente foi retirado nesses processos.

Em estudos realizados por Jorge e colaboradores 2011 [37], detectaram valores de $300,01 \pm 2,29 \mu\text{g/g}$ de carotenóides totais no óleo da polpa de macaúba, resultado muito semelhante ao encontrado neste trabalho.

Embora o consumo de frutas e verduras ricas em carotenóides esteja associado à diminuição de desenvolvimento de algumas doenças crônicas como o câncer, doenças cardiovasculares e outras, ainda não foi estabelecida a ingestão diária recomendada (IDR) para esses compostos. Mas, pode-se calcular a IDR destes micronutrientes a partir da forma ativa da vitamina A no organismo, expressa em retinol equivalente (RE). Cada 1 μg de β -caroteno equivale a 0,167 μg de RE e cada 1 μg dos outros carotenóides com função pró-vitáminica A apresentam 0,084

μg de RE (FAO/WHO, 1967). A ingestão diária recomendada de RE varia de 500 μg para adultos do sexo feminino a 600 μg para adultos do sexo masculino (FAO/WHO, 1988). Portanto, para suprir a IDR, bastaria a ingestão de 15 g de óleo da polpa de macaúba para os homens e 12 g para as mulheres, o equivalente aproximadamente a 1^{1/2} colher de sopa.

3.2. Perfis de ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa do óleo da polpa de macaúba, azeite de oliva virgem extra e frações lipídicas das rações padrão e hipercolesterolêmicas

O perfil de ácidos graxos no óleo da polpa de macaúba e no azeite de oliva virgem extra, apresentou alta concentração de ácidos graxos insaturados. O ácido graxo majoritário foi o ácido oléico em ambos os óleos.

Para a fração lipídica da ração padrão apresentou alta concentração de ácidos graxos insaturados, com predominância do ácido linoléico e ácido oléico. A fração lipídica da ração hipercolesterolêmica apresentou concentrações elevada de ácidos graxos saturados com predominância dos ácidos láurico, mirístico e palmítico.

A proporção de ácidos graxos nos óleos e nas frações lipídicas das rações está demonstrada na Tabela 4. O óleo da polpa de macaúba apresentou concentração de 68,48% de ácidos graxos insaturados e 26,21% de ácidos graxos saturados. Dentre os insaturados, 61,09% era de ácido oléico e nos saturados, 21,42% era de ácido palmítico. O azeite de oliva virgem extra apresentou concentração de 76,37% de ácidos graxos insaturados e 17,53% de ácidos graxos saturados onde, 59,68% era de ácido oléico, 13,97% de ácido linoléico e 15,28% de ácido palmítico.

Tabela 4. Perfil dos ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa do óleo da polpa de macaúba, azeite de oliva virgem extra, frações lipídicas das rações padrão e hipercolesterolêmica.

Ácidos graxos	Macaúba	Oliva	Ração padrão	Ração Hipercolesterolêmica	Legislação Brasileira (IN nº 166)
C 8:0 - Ácido Caprílico	0,32±0,04	nd	nd	3,25±0,13	-
C 10:0 - Ácido Cáprico	0,19±0,02	nd	nd	2,94±0,08	-
C 12:0 - Ácido Láurico	1,00±0,13	nd	nd	24,42±0,76	-
C 13:0 - Ácido Tridecanóico	nd	nd	nd	nd	-
C 14:0 - Ácido Mirístico	0,55±0,06	nd	nd	8,17±0,09	≤ 0,05
C 15:0 - Ácido Pentadecanóico	nd	nd	nd	nd	-
C 16:0 - Ácido Palmítico	21,42±1,37	15,28±0,10	14,20±0,84	20,94±0,05	7,50 a 20,0
C 17:0 - Ácido Heptadecanóico	nd	nd	nd	nd	≤ 0,3
C 18:0 - Ácido Estearico	2,58±0,09	1,86±0,00	2,55±0,07	3,78±0,05	0,5 a 5,0
C 20:0 - Ácido Araquídico	0,15±0,01	0,39±0,01	0,31±0,11	0,26±0,00	≤ 0,6
C 22:0 - Ácido Behênico	nd	nd	0,25±0,09	nd	≤ 0,2
C 24:0 - Ácido Lignocérico	nd	nd	nd	nd	≤ 0,2
Σ % AGS[*]	26,21	17,53	17,32	63,78	-
C 14:1 - Ácido Miristoléico ω-5	nd	nd	nd	nd	-
C 16:1 - Ácido Palmitoléico ω-7	3,33±0,20	1,54±0,01	0,13±0,00	nd	0,3 a 3,5
C 17:1 - Ácido Heptadecanóico	nd	nd	nd	nd	≤ 0,3
C 18:1 - Ácido Elaidico (trans)	nd	nd	nd	nd	≤ 0,05
C 18:1 - Ácido Oléico cis ω-9	61,09±1,45	59,68±0,14	22,69±0,17	25,55±0,42	55,0 a 83,0
C 20:1 - Ácido cis-11-Eicosênico ω-9	0,15±0,00	0,36±0,02	0,31±0,00	0,16±0,01	≤ 0,4
C 22:1 - Ácido Erúcido ω-9	nd	nd	0,105±0,00	nd	-
Σ % AGMI^{**}	64,57	61,58	23,23	25,71	-
C 18:2 - Ácido Linoléico cis ω-6	3,11±0,07	13,97±0,02	50,77±0,10	10,89±0,19	3,5 a 21,0
C 18:2 (trans) + C 18:3 trans	nd	nd	nd	nd	≤ 0,05
Σ % ω-6	3,11	13,97	50,77	10,89	-
C 18:3 n3 – ácido Linolênico ω-3	0,80±0,03	0,82±0,00	3,87±0,03	0,25±0,00	≤ 1,0
Σ % ω-3	0,80	0,82	3,87	0,25	-
Σ % AGPI^{**} (ω-6 + ω-3)	3,91	14,80	54,64	11,14	-
C 20:5 – Ácido eicosapentaenoico (EPA – ω-3)	nd	nd	nd	nd	-
C 22:5 – Ácido docosapentaenoico (DPA – ω-3)	nd	nd	nd	nd	-
C 22:6 – Ácido docosahexaenoico (DHA – ω-3)	nd	nd	nd	nd	-
Σ NI^{****}	3,31	3,62	3,10	0,42	-

*AGS – Ácidos Graxos Saturados.

**AGMI – Ácidos Graxos Monoinsaturados.

***AGPI – Ácidos Graxos poliinsaturados.

****NI – Não Identificados

nd - Não Detectado.

A fração lipídica da ração padrão apresentou concentração de 77,87% de ácidos graxos insaturados e 17,32% de ácidos graxos saturados. Dentre os insaturados, 50,77% da composição, é de ácido linoléico e 22,69% de ácido oléico. Nos saturados, 14,20% era de ácido palmítico. A fração lipídica da ração hipercolesterolêmica apresentou 36,85% de ácidos graxos insaturados e 63,78% de saturados. Nos insaturados foram encontrados 25,55% de ácido oléico e 10,89% de

ácido linoléico. Nos saturados foram encontrados 24,42% de ácido láurico, 8,17% de ácido mirístico e 20,93% de ácido palmítico. Os valores comentados foram dos ácidos graxos que apresentaram resultados mais relevantes.

Os resultados encontrados para o óleo da polpa de macaúba, utilizado neste trabalho, assemelham-se muito aos reportados por AMARAL e colaboradores [38], o qual detectou a concentração do ácido oléico em torno de 69,07% e ácido palmítico de 12,18%. Em relação ao azeite de oliva virgem extra, observa-se que o óleo empregado neste ensaio apresenta proporção de ácido oléico inferior a valores relatados por diversos outros autores.

ROOYEN e colaboradores [39] verificaram uma concentração do ácido oléico de 72 a 78,9%, de ácido palmítico de 10,1% e ácido linoléico de 5,7%. PERONA e colaboradores [40] mostraram uma concentração de ácido oléico de $74,6 \pm 0,6$ e $66,5 \pm 2,0$, ácido palmítico de $10,9 \pm 1,8$ e $13,9 \pm 1,9$ e ácido linoléico de $4,5 \pm 0,4$ e $9,7 \pm 1,4$.

Em outro trabalho de PERONA e colaboradores [41], mostraram uma concentração de ácido oléico de 72,40%, 14,43% de ácido palmítico e 7,99% de ácido linoléico. HUANG e colaboradores [42] encontraram uma concentração de ácido oléico de 83,1%, ácido palmítico 6,6% e ácido linoléico de 5,1%.

Segundo a Instrução Normativa número 166, referente ao regulamento técnico dos azeites de oliva, publicada no Diário Oficial da União (DOU) em 30 de agosto de 2010 [59], define que o limite de tolerância de parâmetro de identidade do azeite de oliva virgem extra, azeite de oliva virgem, azeite de oliva e azeite de oliva refinado, o ácido oléico deverá estar entre 55,0 a 83,0 %. Portanto, a concentração de ácido oléico encontrado no óleo da polpa de macaúba utilizado em nosso experimento estava dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira.

O hábito alimentar que inclui um alto consumo de azeite de oliva com alta concentração de ácido oléico é a principal alegação da baixa frequência de marcadores ligados a processos inflamatórios, doenças cardiovasculares e controle de dislipidemias na população mediterrânea [62]. Este ácido graxo vem sendo incorporado a outros óleos que possuem baixa concentração, a fim de oferecer propriedades benéficas à saúde e aumentar a estabilidade oxidativa do produto [42]. O óleo da polpa de macaúba não necessita dessa adição, e pode ser considerada como fonte natural desse componente, atendendo desta forma as necessidades industriais e nutricionais.

Para a verificação da qualidade nutricional de um óleo existem índices que são o de aterogenicidade (IA), trombogenicidade (IT) e a razão dos ácidos graxos hipocolesterolêmicos/hipercolesterolêmicos (H/H).

Segundo ULBRICHT e SOUTHGATE [23], os índices de aterogenicidade e trombogenicidade indicam o potencial de incidência de risco de doenças cardiovasculares que um óleo pode causar. Não existem valores recomendados, mas quanto menor o resultado destes parâmetros melhor a qualidade nutricional do óleo. Os índices de aterogenicidade (IA) e trombogenicidade (IT) indicam o potencial de estímulo à agregação plaquetária [43]. Quanto mais baixos os valores destes índices, maior a disponibilidade de ácidos graxos anti-aterogênicos. O benefício resultante é o menor risco de formação de trombos, com conseqüente potencial preventivo às doenças coronarianas.

A razão (H/H) está relacionada com a atividade funcional dos ácidos graxos em relação ao metabolismo do colesterol [44]. A quantificação reflete o maior ou menor risco de incidência de doenças cardiovasculares. Quanto mais elevados os resultados mais desejáveis serão os benefícios do óleo, indicando uma maior proporção de ácidos graxos insaturados.

A avaliação destes índices indicou que o óleo de macaúba, potencialmente seria menos favorável à saúde do que o óleo de oliva (Tabela 5). Isto se deve ao maior teor de ácido palmítico presente na macaúba. A razão padrão, mais abundante em ácidos graxos polinsaturados - linoléico e linolênico - apresentou índices mais favoráveis. Obviamente, a razão hipercolesterolêmica é deletéria em todos estes parâmetros.

Tabela 5. Índices de qualidade nutricional de óleos em diferentes fontes.

Índices	Óleo da polpa de macaúba	Óleo de oliva virgem extra	Ração padrão	Ração hipercolesterolêmica
Aterogenicidade	0,359	0,200	0,182	2,103
Trombogenicidade	0,709	0,451	0,450	1,790
Razão H/H*	2,958	4,872	5,444	1,260

* hipocolesterolêmicos / hipercolesterolêmicos.

Em estudos reportados por BASIRON [45], FIRESTONE [46] e HAMMOND e colaboradores [47] calcularam os índices de aterogenicidade, trombogenicidade e razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos do óleo de palma bruto, azeite de oliva e óleo de soja. O óleo de palma apresentou IA (0,98) e IT (1,93) superior ao encontrado no óleo da polpa de macaúba, no entanto, resultados inferiores foram observados no azeite de oliva, IA (0,10) e IT (0,24), e óleo de soja, IA (0,13) e IT (0,24). Estes índices demonstram que o óleo de polpa de macaúba apresenta maior disponibilidade de ácidos graxos anti-aterogênicos do que o óleo de palma. Por outro lado, o azeite de oliva e o óleo de soja apresentaram índices mais desejáveis que o óleo da polpa de macaúba.

Em relação à razão H/H, o óleo de palma apresentou menor quantidade de ácidos graxos hipocolesterolêmicos (1,10), enquanto o azeite de oliva (10,37) e o óleo de soja (7,77), apresentando maiores concentrações que o óleo da polpa de macaúba. TONIAL e colaboradores [48] observaram que a razão H/H do óleo da polpa de macaúba mostrou-se melhor do que ao observado na fração lipídica de alguns peixes. Valores inferiores ao encontrado no óleo da polpa de macaúba podem ser observados nos óleos de peixes como cachara (1,75), pintado (1,84), pacu (1,66), dourado (1,49) e salmão (2,34).

Deve-se considerar que a interferência sobre parâmetros ligados ao favorecimento de doenças cardiovasculares, considera também outras moléculas presentes na alimentação e especialmente nos óleos, como os antioxidantes. Portanto, estes parâmetros não são exclusivos para determinar a ação biológica no metabolismo animal.

3.3. Ensaios *in vivo*

Os experimentos com animais foram esquematizados para responder a duas questões distintas. No experimento 1 o objetivo foi avaliar a resposta da adição de óleos ricos em ácido oléico em uma dieta promotora da hipercolesterolemia, administrada continuamente. O experimento 2 está relacionado com a ação dos óleos *high oleic*, quando a dieta hipercolesterolêmica é suspensa e substituída por uma dieta convencional.

3.3.1. Experimento *in vivo* 1

A dieta hipercolesterolêmica promoveu alteração intensa no nível de colesterol total, sendo a fração LDL a principal responsável (Tabela 6). Em dieta normal a concentração de HDL e LDL nos ratos é similar. No entanto, com a dieta indutora, o teor de HDL aumentou 44% e o de LDL 500%. A suplementação de óleo da polpa de macaúba (Grupo H14M7) e de azeite de oliva (Grupo H14O7), embora não tenha revertido o teor elevado de LDL nos animais amostrados, apresentou uma tendência de redução. Nestes grupos o teor de HDL foi similar ao grupo N14 e diminuída em relação ao grupo H14.

Diferentemente dos demais índices séricos, a concentração de VLDL e de triglicerídeos não foram alteradas pela alimentação com ração hipercolesterolêmica (Tabela 6). A adição de azeite de oliva virgem extra reduziu os teores destes parâmetros.

Tabela 6. Perfil lipídico em ratos *Wistar* machos alimentados com ração hipercolesterolêmica e suplementados com óleo de oliva virgem extra ou óleo da polpa de macaúba.

Variável	Grupo experimental				Valor de p
	N14	H14	H14O7	H14M7	
Colesterol total (mg/dL)	67,14±3,05b	206,67±12,09a	174,20±13,93a	198,83±13,89a	<0,001
HDL (mg/dL)	24,38±1,16b	35,00±2,65a	19,40±2,38b	23,75±1,31b	<0,001
LDL (mg/dL)	24,33±1,96b	149,80±13,71a	125,60±15,40a	110,75±12,62a	<0,001
VLDL (mg/dL)	16,75±0,67a	16,29±0,94a	11,43±0,84b	16,50±1,18a	0,001
Triglicerídeos (mg/dL)	83,57±3,93a	90,50±6,26a	57,29±4,19b	82,00±6,11a	0,001

Os valores estão apresentados em média±erro padrão da média. Letras diferentes na linha indicam diferença significativa entre os grupos experimentais, para aquela variável, no pós-teste de Tukey. N14 - Animais alimentados com ração padrão por 14 dias; H14 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias; H14O7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias e suplementados com azeite de oliva virgem extra nos 7 dias finais; H14M7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias e suplementados com óleo da polpa de macaúba nos 7 dias finais.

Em relação aos marcadores sanguíneos do perfil hepático, todos os grupos alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias apresentaram aumento na taxa de bilirrubina total (Tabela 7). A taxa de fosfatase alcalina observada no grupo H14 foi maior que os demais grupos. Não houve alteração entre os grupos experimentais, em relação às variáveis: bilirrubina direta, aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT) e gama glutamil transferase (GGT) (Tabela 7).

Tabela 7. Perfil hepático em ratos *Wistar* machos alimentados com ração hipercolesterolêmica e suplementados com óleo de oliva virgem extra ou óleo da polpa de macaúba.

Variável	Grupo experimental				Valor de p
	N14	H14	H14O7	H14M7	
Bilirrubina total (mg/dL)	0,00±0,00b	0,05±0,02ab	0,09±0,03a	0,07±0,01ab	0,031
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,05±0,00a	0,05±0,00a	0,06±0,01a	0,04±0,01a	0,324
AST (U/L)*	157,17±17,80a	129,86±6,62a	207,67±34,87a	198,83±46,28a	0,218
ALT (U/L)**	89,17±6,39a	49,29±2,31a	90,60±21,29a	71,50±9,46a	0,032
Fosfatase alcalina (U/L)	226,71±13,98c	1504,50±83,93a	426,83±46,40bc	553,57±56,50b	<0,001
GGT***	0,25±0,16a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,13±0,13a	0,278

Os valores estão apresentados em média±erro padrão da média. Letras diferentes na linha indicam diferença significativa entre os grupos experimentais, para aquela variável, no pós-teste de Tukey.

* AST – Aspartato Amino Transferase.

** ALT – Alanina Amino Transferase.

***GGT – Gama Glutamil Transferase.

N14 - Animais alimentados com ração padrão por 14 dias; H14 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias; H14O7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias e suplementados com azeite de oliva virgem extra nos 7 dias finais; H14M7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias e suplementados com óleo da polpa de macaúba nos 7 dias finais.

Não houve influência das dietas na taxa de glicose (Tabela 8). Quanto ao perfil renal, a concentração de uréia foi superior no grupo N14 e a creatinina apresentou-se aumentada neste grupo em relação ao grupo H14.

Tabela 8. Glicemia e perfil renal em ratos *Wistar* machos alimentados com ração hipercolesterolêmica e suplementados com óleo de oliva virgem extra ou óleo da polpa de macaúba.

Variável	Grupo experimental				Valor de p
	N14	H14	H14O7	H14M7	
Glicose (mg/dL)	166,83±12,56a	170,00±5,33a	176,40±10,25a	141,50±10,01a	0,100
Uréia (mg/dL)	34,63±1,10a	14,86±1,01c	24,00±0,82b	15,25±1,00c	<0,001
Creatinina (mg/dL)	0,31±0,02a	0,24±0,01b	0,29±0,01ab	0,30±0,02ab	0,023

Os valores estão apresentados em média±erro padrão da média. Letras diferentes na linha indicam diferença significativa entre os grupos experimentais, para aquela variável, no pós-teste de Tukey. N14 - Animais alimentados com ração padrão por 14 dias; H14 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias; H14O7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias e suplementados com azeite de oliva virgem extra nos 7 dias finais; H14M7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias e suplementados com óleo da polpa de macaúba nos 7 dias finais.

Para eletrólitos, a quantidade de sódio, potássio e cloretos no grupo H14O7 foi maior do que os demais grupos experimentais (Tabela 9).

Tabela 9. Eletrólitos em ratos *Wistar* machos alimentados com ração hipercolesterolêmica e suplementados com óleo de oliva virgem extra ou óleo da polpa de macaúba.

Variável	Grupo experimental				Valor de p
	N14	H14	H14O7	H14M7	
Na (mEq/L)	136,66±0,57c	141,45±0,51b	146,94±0,52a	138,05±0,67c	<0,001
K (mEq/L)	7,28±0,17b	6,96±0,16b	8,03±0,20a	7,03±0,19b	0,001
Cl (mEq/L)	106,23±1,00b	102,64±0,43c	108,98±0,64a	103,39±0,46c	<0,001

Os valores estão apresentados em média±erro padrão da média. Letras diferentes na linha indicam diferença significativa entre os grupos experimentais, para aquela variável, no pós-teste de Tukey. N14 - Animais alimentados com ração padrão por 14 dias; H14 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias; H14O7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias e suplementados com azeite de oliva virgem extra nos 7 dias finais; H14M7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias e suplementados com óleo da polpa de macaúba nos 7 dias finais.

Em relação aos parâmetros corporais, o ganho de peso foi superior no grupo H14O7 (Tabela 10). Por outro lado, neste grupo observou-se acúmulo de tecido adiposo igual ao dos animais do grupo controle (N14) (Tabela 10). O óleo de macaúba embora não tenha promovido aumento no ganho de peso, resultou em maior acúmulo de gordura visceral (Tabela 10).

Tabela 10. Parâmetros corporais em ratos *Wistar* machos induzidos à hipercolesterolemia e suplementados com óleo de oliva virgem extra ou óleo de macaúba.

Variável	Grupo experimental				Valor de p
	N14	H14	H14O7	H14M7	
Ganho de peso (g/dia)*	7,42±1,00b	6,03±0,82b	9,14±0,58a	7,35±1,72b	<0,001
Tecido adiposo (mg/g peso final)**	20,11±2,38b	34,37±1,14a	26,32±6,46b	35,29±4,32a	<0,001

Os valores estão apresentados em média±erro padrão da média. Letras diferentes na linha indicam diferença significativa entre os grupos experimentais, para aquela variável, no pós-teste de Tukey.

*ganho de peso obtido pela razão (peso final - inicial)/14 dias.

** peso de tecido adiposo em relação ao peso final.

N14 - Animais alimentados com ração padrão por 14 dias; H14 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias; H14O7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias e suplementados com azeite de oliva virgem extra nos 7 dias finais; H14M7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias e suplementados com óleo da polpa de macaúba nos 7 dias finais.

O estudo anatomopatológico de fígado mostrou alteração no tecido hepático em todos os grupos que receberam alimentação com ração hipercolesterolêmica (Tabela 11). As alterações variaram de grande a intensa.

Tabela 11. Magnitude de alteração anatomopatológica em tecido hepático de ratos *Wistar* machos induzidos à hipercolesterolemia e suplementados com oliva virgem extra e óleo de polpa de macaúba.

Variável	Grupo experimental				Valor de p
	N14	H14	H14O7	H14M7	
Nível de alteração hepática	(-)b	(++++a)	(+++a)	(++++a)	<0,001

Letras diferentes na linha indicam diferença significativa entre os grupos experimentais, no pós-teste de Tukey. Sinais indicam: (-) sem alteração; (+) pequena alteração; (++) moderada alteração; (+++) grande alteração e (++++) intensa alteração. N14 - Animais alimentados com ração padrão por 14 dias; H14 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias; H14O7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias e suplementados com azeite de oliva virgem extra nos 7 dias finais; H14M7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias e suplementados com óleo da polpa de macaúba nos 7 dias finais.

O fígado dos animais hipercolesterolêmicos apresentou aspecto de esteatose hepática (Figura 6).

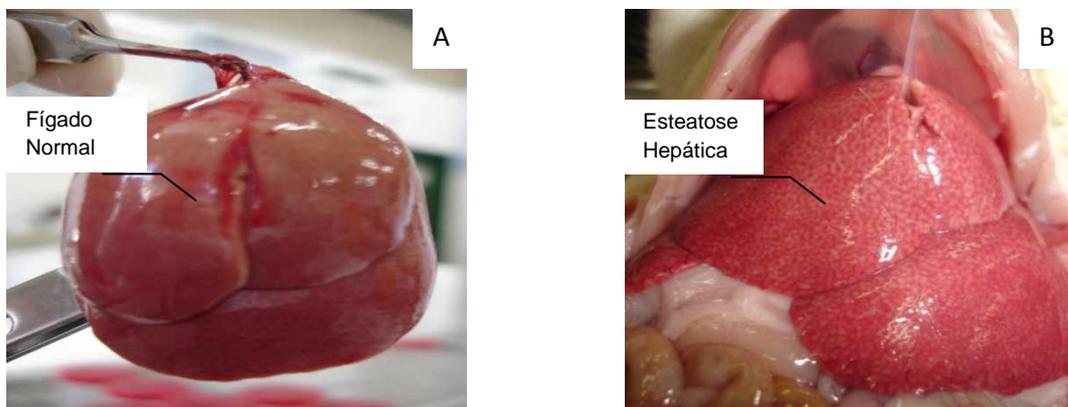


Figura 6. Fígado de ratos *Wistar* machos alimentados com ração padrão (A) e alimentados com ração hipercolesterolêmica (B) por 14 dias.

A promoção de mutagênese não foi observada nos grupos hipercolesterolêmicos (Figura 7). Contudo, assim como nas taxas de LDL, houve uma tendência de valores mais reduzidos de micronúcleos nos tratamentos com os óleos de macaúba e oliva.

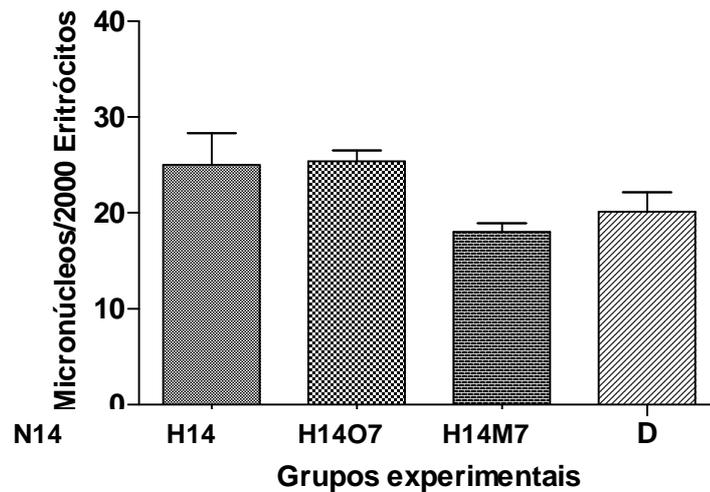


Figura 7: Avaliação do ensaio mutagênico do óleo da polpa de macaúba e do azeite de oliva virgem extra em ratos *Wistar* machos. N14 - Animais alimentados com ração padrão por 14 dias; H14 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias; H14O7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias e suplementados com azeite de oliva virgem extra nos 7 dias finais; H14M7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias e suplementados com óleo da polpa de macaúba nos 7 dias finais. A barra representa o desvio padrão e a coluna a média. A análise estatística utilizada foi o teste de análise de variância (ANOVA) juntamente com o pós-teste de Bonferroni e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

3.3.2. Experimento *in vivo* 2

A taxa de colesterol total do grupo H7N7 foi aumentada em relação aos grupos H7O7 e H7M7 (Tabela 12). A LDL-lipoproteína foi a fração responsável por este valor mais alto do colesterol total. A concentração de VLDL foi igual entre os grupos (Tabela 12). Por outro lado, a suplementação com os óleos de macaúba e oliva após a substituição da ração hiperlipidêmica pela ração normal, levou a uma redução dos teores de triglicerídeos (Tabela 12).

Tabela 12. Perfil lipídico de ratos *Wistar* machos induzidos à hipercolesterolemia com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementação com óleo da polpa de macaúba ou azeite de oliva virgem extra.

Variável	Grupo experimental			Valor de p
	H7N7	H7O7	H7M7	
Colesterol total (mg/dL)	84,33±3,04b	107,57±4,72a	108,86±4,27a	0,001
HDL (mg/dL)	29,43±1,11a	32,43±1,60a	30,17±1,25a	0,274
LDL (mg/dL)	32,83±3,22b	49,50±3,91a	64,50±5,12a	<0,001
VLDL (mg/dL)	21,13±1,71a	17,25±1,47a	16,75±1,13a	0,090
Triglicerídeos (mg/dL)	107,50±6,57a	85,33±5,28b	82,00±3,70b	0,008

Os valores estão apresentados em média±erro padrão da média. Letras diferentes na linha indicam diferença significativa entre os grupos experimentais, para aquela variável, no pós-teste de Tukey. H7N7 – Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias; H7O7 – Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementados com azeite de oliva virgem extra nos 7 dias finais; H7M7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementados com óleo da polpa de macaúba nos 7 dias finais.

Em relação ao perfil hepático, a taxa de bilirrubina total do grupo H7N7, foi maior que no grupo H7M7. As taxas de bilirrubina direta, aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT), fosfatase alcalina e gama glutamil transferase (GGT) não variaram entre os grupos experimentais (Tabela 13).

Tabela 13. Perfil hepático de ratos *Wistar* machos induzidos à hipercolesterolemia com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementação com óleo da polpa de macaúba ou azeite de oliva virgem extra.

Variável	Grupo experimental			Valor de p
	H7N7	H7O7	H7M7	
Bilirrubina total (mg/dL)	0,03±0,01a	0,01±0,01ab	0,00±0,00b	0,018
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,04±0,01a	0,05±0,00a	0,05±0,00a	0,565
AST (U/L)	228,38±58,78a	223,71±6,99a	278,00±23,34a	0,619
ALT (U/L)	113,63±19,11a	95,00±5,72a	95,50±8,78a	0,546
Fosfatase alcalina (U/L)	237,00±16,57a	265,71±16,66a	299,00±22,04a	0,084
GGT	0,88±0,35a	0,25±0,16a	0,38±0,38a	0,342

Os valores estão apresentados em média±erro padrão da média. Letras diferentes na linha indicam diferença significativa entre os grupos experimentais, para aquela variável, no pós-teste de Tukey.

* AST – Aspartato Amino Transferase.

** ALT – Alanina Amino Transferase.

***GGT – Gama Glutamil Transferase.

H7N7 – Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias; H7O7 – Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementados com azeite de oliva virgem extra nos 7 dias finais; H7M7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementados com óleo da polpa de macaúba nos 7 dias finais.

A taxa de glicemia do grupo H7O7 foi inferior ao grupo H7N7 (Tabela 14). A concentração de uréia não diferiu entre os grupos experimentais. A menor taxa de creatinina foi determinada no grupo H7M7 (Tabela 14).

Tabela 14. Glicemia e perfil renal de ratos *Wistar* machos induzidos à hipercolesterolemia com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementação com óleo da polpa de macaúba ou azeite de oliva virgem extra.

Variável	Grupo experimental			Valor de p
	H7N7	H7O7	H7M7	
Glicose (mg/dL)	162,00±12,32a	86,00±15,01b	123,83±11,86ab	0,003
Uréia (mg/dL)	43,71±3,27a	41,50±1,70a	38,13±1,66a	0,234
Creatinina (mg/dL)	0,31±0,02ab	0,35±0,01a	0,29±0,02b	0,056

Os valores estão apresentados em média±erro padrão da média. Letras diferentes na linha indicam diferença significativa entre os grupos experimentais, para aquela variável, no pós-teste de Tukey. H7N7 – Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias; H7O7 – Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementados com azeite de oliva virgem extra nos 7 dias finais; H7M7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementados com óleo da polpa de macaúba nos 7 dias finais.

Os valores dos eletrólitos sódio, potássio e cloretos não diferiram entre os tratamentos no ensaio *in vivo* 2 (Tabela 15).

Tabela 15. Eletrólitos em ratos *Wistar* machos induzidos à hipercolesterolemia com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementação com óleo da polpa de macaúba ou azeite de oliva virgem extra.

Variável	Grupo experimental			Valor de p
	H7N7	H7O7	H7M7	
Na (mEq/L)	132,68±5,33a	142,31±3,66a	141,91±1,58a	0,159
K (mEq/L)	7,07±0,32a	7,46±0,27a	7,54±0,38a	0,537
Cl (mEq/L)	98,81±5,77a	99,50±0,73a	100,16±0,82a	0,961

Os valores estão apresentados em média±erro padrão da média. Letras diferentes na linha indicam diferença significativa entre os grupos experimentais, para aquela variável, no pós-teste de Tukey. H7N7 – Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias; H7O7 – Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementados com azeite de oliva virgem extra nos 7 dias finais; H7M7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementados com óleo da polpa de macaúba nos 7 dias finais.

Em relação aos parâmetros corporais, o ganho de peso dos animais do grupo H7M7 foi menor do que para os demais grupos experimentais. Para o acúmulo de tecido adiposo visceral, não houve alteração entre os grupos experimentais (Tabela 16).

Tabela 16. Parâmetros corporais de ratos *Wistar* machos induzidos à hipercolesterolemia com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementação com óleo da polpa de macaúba ou azeite de oliva virgem extra.

Variável	Grupo experimental			Valor de p
	H7N7	H7O7	H7M7	
Ganho de peso (g/dia)*	10,97±2,84a	8,07±1,32b	5,02±2,22c	0,0004
Tecido adiposo (mg/g peso final)**	28,59±2,45a	25,60±4,87a	25,22±5,57a	NS

Os valores estão apresentados em média±erro padrão da média. Letras diferentes na linha indicam diferença significativa entre os grupos experimentais, para aquela variável, no pós-teste de Tukey.

*ganho de peso foi obtido pela razão (peso final - inicial)/14 dias.

** peso de tecido adiposo em mg em relação ao peso final g.

H7N7 – Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias; H7O7 – Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementados com azeite de oliva virgem extra nos 7 dias finais; H7M7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementados com óleo da polpa de macaúba nos 7 dias finais.

A avaliação anatomopatológica do fígado indicou que ocorreram alterações para todos os grupos avaliados (Tabela 17). Os grupos H7N7 e H7M7 apresentaram pequena alteração, enquanto que no grupo H7O7 os danos foram intensos.

Tabela 17. Magnitude de alteração anatomopatológica em tecido hepático de ratos *Wistar* machos induzidos à hipercolesterolemia com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguida de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementados ou não com óleo da polpa de macaúba ou azeite de oliva.

Variável	Grupo experimental			Valor de P
	H7N7	H7O7	H7M7	
Nível de alteração hepática	(+)b	(+++) ^a	(+)b	0,002

Letras diferentes na linha indicam diferença significativa entre os grupos experimentais, no pós-teste de Tukey. Sinais indicam: (-) sem alteração; (+) pequena alteração; (++) moderada alteração; (+++) grande alteração e (+++++) intensa alteração. H7N7 – Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias; H7O7 – Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementados com azeite de oliva virgem extra nos 7 dias finais; H7M7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementados com óleo da polpa de macaúba nos 7 dias finais.

Observou-se maior número de micronúcleos no grupo H7M7 (Figura 8).

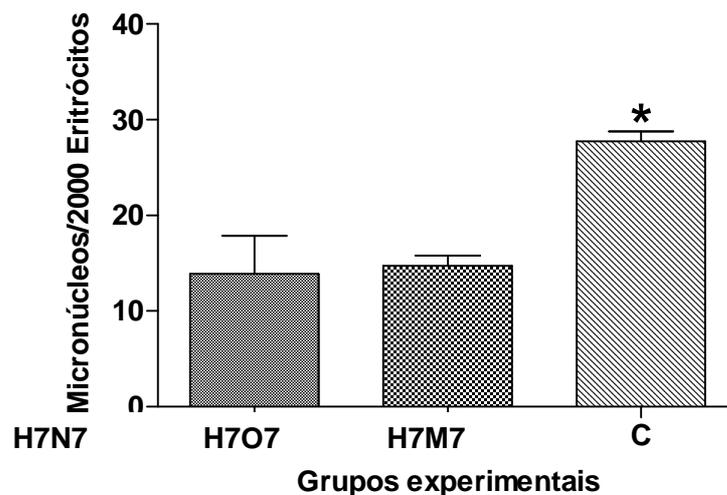


Figura 8: Avaliação do ensaio mutagênico do óleo da polpa de macaúba e do azeite de oliva virgem extra em ratos *Wistar* machos. H7N7 – Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias; H7O7 – Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementados com azeite de oliva virgem extra nos 7 dias finais; H7M7 - Animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 7 dias, seguido de substituição por ração padrão por mais 7 dias e suplementados com óleo da polpa de macaúba nos 7 dias finais. A barra representa o desvio padrão e a coluna a média. O asterístico representa dados significativos. A análise estatística utilizada foi o teste de análise de variância (ANOVA) juntamente com o pós-teste de Bonferroni e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

4. Discussão

4.1. Perfil Lipídico

Em estudos realizados por Pérez-Jiménes e colaboradores [49] e pela FDA (FOOD DRUG ADMINISTRATION DOS EUA), mostraram que o ácido oléico e os compostos fenólicos presentes no azeite de oliva virgem extra, reduzem os fatores de risco e outros mecanismos relacionados à aterogênese. Reduzem os triglicerídeos e aumentam a HDL-colesterol quando os carboidratos são substituídos por dietas ricas em ácido oléico. Reduzem o LDL-colesterol quando se substitui a gordura saturada por dietas ricas em gordura monoinsaturadas. Melhoram o metabolismo da glicose em diabéticos. Trabalhos realizados por Binkoski e colaboradores [50] mostraram que dietas realizadas com óleo de girassol, canola, milho tiveram um desempenho na diminuição do colesterol total e da LDL-colesterol

em torno de 12 a 13%, enquanto o azeite de oliva virgem ficou em apenas 7%. Em outro estudo, realizados por NICOLOSIA e colaboradores [51], mostraram que hamster tratados com óleo de girassol contendo uma concentração média de ácido oléico tiveram reduções do LDL colesterol. Em outro grupo de animais tratados com azeite com altas concentrações de ácido oléico e linoléico apresentaram aumentos significativos dos triglicerídeos. Neste trabalho, a hipótese era de que o óleo da polpa de macaúba e o azeite de oliva virgem extra promoveriam uma diminuição do colesterol total, LDL-colesterol e aumento do HDL-colesterol em virtude das altas concentrações de ácido oléico nesses óleos. No entanto, não foi este o resultado observado, mesmo com a remoção da dieta hipercolesterolêmica. Pode-se supor que houve uma potencialização dos efeitos dislipidêmicos das rações com a suplementação com os óleos. A redução de uma dieta rica em gordura e administração de ácidos graxos monoinsaturados poderia surtir um efeito antidislipidêmico. As últimas recomendações da American Heart Association dos Estados Unidos em relação aos lipídeos para indivíduos com doenças cardiovasculares pré-existentes são: consumo de 25% a 35% de lipídeos, com <7% saturados, até 10% poliinsaturados e <200 mg de colesterol por dia. No entanto, a recomendação para a população em geral é de <30% de gorduras, <10% saturadas, até 10% polinsaturadas e <300 mg de colesterol por dia [52].

Em estudos realizados por White [53], mostrou que dietas ricas em ácidos graxos saturados e gorduras trans podem aumentar o risco das doenças coronarianas. Demonstrou que os ácidos graxos de cadeia com menos de 10 carbonos são menos propensos a afetar os níveis de colesterol sérico, enquanto que, os de cadeia de 12, 14 ou 16 átomos de carbono são mais susceptíveis a aumentar o LDL-colesterol. Exceção é o ácido esteárico (18 carbonos) que não aumenta o colesterol sérico. Mostrou também que o consumo excessivo de gorduras polinsaturadas não é recomendado por causa do risco de ganho de peso e do aumento de cálculos biliares.

PERONA e colaboradores [54] mostraram que além dos ácidos graxos insaturados, outros componentes (polifenóis, tocoferóis, triterpenóides) presentes nos óleos vegetais, possuem atividades anti-aterosclerótica. Estes autores reportaram que os habitantes da ilha de Creta possuem as menores taxas de doenças cardiovasculares e câncer do mundo, e atribuíram este comportamento ao alto consumo de ácido oléico e α -linolênico e menores ingestão de gorduras

saturadas e ácido linoléico. Evidências mostraram que o ácido α -linolênico e o ácido oléico e outros ácidos graxos, exercem um efeito protetor no tecido endotelial como é o caso do ácido docosaheptaenóico que diminui a adesão e a produção de monócitos.

4.2. Perfil Hepático

Em relação ao perfil hepático, o aumento dos componentes como a bilirrubina total e a fosfatase alcalina (Tabela 7), mostrou uma possível ação deletéria da ração hipercolesterolêmica, alterando diretamente a funcionabilidade do fígado e provocando lesões devido ao acúmulo de gordura neste órgão (esteatose). Este resultado foi confirmado pelo exame anatomopatológico do tecido hepático dos ratos utilizados neste experimento (Tabela 16 e 17). Quando uma dieta é consumida, os triglicerídeos são armazenados e metabolizados no fígado. O acúmulo excessivo de triglicerídeo neste órgão, poderá causar hepatomegalia como resultado de esteatose.

4.3. Glicemia e Perfil Renal

A administração intracerebroventricular (hipotálamo) de ácido oleico inibe a produção de glicose e a ingestão de alimentos [55]. A ação ocorre em parte no hipotálamo e em neurônios e outras regiões do sistema nervoso central, através da inibição da produção da insulina e leptina, que por sua vez, modulam o “apetite”, gasto de energia e o metabolismo intermediário através dos receptores hipotalâmicos. A longa cadeia carbônica, os radicais e a insaturação do ácido oléico fornece sinal de abundância de nutrientes para as áreas distintas dentro do sistema nervoso central (SNC). Nos ensaios realizados pode-se observar que no experimento onde a ração hipercolesterolêmica foi interrompida (ensaio *in vivo* 2), e suplementada com óleo de oliva, a taxa glicêmica foi reduzida, comparativamente ao o grupo alimentado com o mesmo padrão de rações mas sem a suplementação oleosa. Possivelmente, estes dados indicam o efeito alegado a maior disponibilidade de ácido oléico sobre o metabolismo da glicose.

O teor de uréia e creatinina não sofreram alterações nos animais com alimentação com ração hipercolesterolêmica por 14 dias, suplementados ou não

com o óleo de macaúba e com o azeite de oliva. Mesmo com o acúmulo de gordura observada na região perirenal durante a necropsia dos animais para retirada da gordura visceral, não influenciou na excreção desses analitos.

4.4. Parâmetros corporais

Acúmulo de gordura epididimal e perirenal foi observado por Samane e colaboradores [56], em ratos tratados com dietas hipercolesterolêmicas. Nosso experimento mostrou acúmulo de tecido adiposo visceral, maior nos grupos alimentados continuamente com ração hipercolesterolêmica e suplementados ou não com óleo de macaúba e no grupo alimentado parcialmente com ração hipercolesterolêmica sem suplementação oleosa (Tabelas 10 e 15). A gordura estava presente em toda região abdominal e preferencialmente na bolsa escrotal, envolvendo os rins, entre os intestinos e na parte interna do dorso.

O ganho de peso dos animais tratados com óleo de macaúba foi menor quando se substituiu a ração indutora de hipercolesterolemia pela ração padrão. Um ganho maior foi observado quando a suplementação foi realizada com óleo de oliva em animais alimentados com ração hipercolesterolêmica por 14 dias. Não é possível estabelecer uma relação com maior disponibilidade de ácido oléico e redução de apetite com os dados deste trabalho, uma vez que o azeite de oliva mesmo contendo elevada proporção deste ácido graxo não implicou em menor peso o que está correlacionado com o consumo de alimento. Enquanto que no caso do óleo de macaúba este fenômeno foi observado. Como a quantidade de ração ingerida não foi determinada não se pode inferir se houve ou não redução de consumo de ração.

4.5. Anatomopatológico de Fígado

Os ratos tratados com a ração padrão não apresentaram alterações celulares ou citoplasmáticas no tecido hepático. Mas, os grupos de ratos que receberam a alimentação com ração hipercolesterolêmica apresentaram alterações, indicando acúmulo de gordura (esteatose). Os resultados deste trabalho não permitem correlacionar estes danos com o acúmulo de triglicerídeos, uma vez que o nível deste parâmetro sérico não foi alterado pela ração hipercolesterolêmica. Até mesmo

no grupo H14O7, onde se encontrou o mais baixo teor de triglicerídeos, ocorreram lesões no fígado.

4.6. Mutagênese

Evangelista e colaboradores [57] testaram doses de óleo de canola, óleo de oliva, óleo de oliva virgem e óleo de milho, e constataram que apenas o óleo de oliva, oliva virgem e canola mostraram efeitos protetores inibindo danos oxidativos ao DNA. Entretanto, outros autores ao avaliarem a atividade mutagênica de vários óleos pelo ensaio da *Drosophila* puderam observar que o azeite de oliva virgem extra apresentou claramente um efeito mutagênico por este método [58]. Não foi observada alteração para os grupos suplementados com azeite de oliva virgem extra no presente experimento.

No ensaio de substituição da ração hipercolesterolêmica pela ração normal observou-se maior número de micronúcleos nos animais suplementados com óleo de macaúba (Figura 8). No entanto, em termos quantitativos este número é próximo ao apresentado pelos animais controle que só receberam ração normal ou ração hipercolesterolêmica (Figura 7). Desta forma, a ração hipercolesterolêmica parece não ser um agente indutor de mutagênese e os óleos testados também não apresentaram esta propriedade.

5. Conclusão

O óleo da polpa de macaúba, comparativamente aos padrões oficiais para o azeite de oliva, apresentou elevada acidez, mas sem indicações de processo de oxidação. A proporção de ácido oléico foi similar entre ambos os óleos, ao redor de 60%. O óleo da polpa de macaúba apresentou alta concentração de carotenóides.

Nos experimentos *in vivo*, a ração hipercolesterolêmica promoveu aumento nas concentrações séricas do perfil lipídico de colesterol total e LDL colesterol.

A suplementação com óleo de macaúba e azeite de oliva na alimentação dos ratos, embora no prazo avaliado não tenha revertido os efeitos deletérios da dieta hipercolesterolêmica, mostrou uma tendência de redução das taxas de colesterol total, LDL-colesterol e da glicose.

No perfil hepático mesmo após a suplementação com os óleos, a ração hipercolesterolêmica promoveu o aumento significativo da fosfatase alcalina e em menor proporção da bilirrubina total. O grupo de ratos, onde a ração hipercolesterolêmica foi substituída por ração padrão e suplementação com óleo de macaúba, apresentou os menores índices de creatinina. A concentração de uréia foi reduzida quando a suplementação com óleo de macaúba foi feita simultaneamente à dieta hipercolesterolêmica.

O óleo de macaúba promoveu menor ganho de peso quando a ração hipercolesterolêmica foi substituída pela ração padrão. Porém, maior acúmulo de tecido adiposo no grupo alimentado com ração hipercolesterolêmica por 14 dias e suplementado com óleo de macaúba.

As lesões no fígado promovidas pela dieta hipercolesterolêmica, não foram agravadas pela suplementação com óleo de macaúba.

Não foi observado ação mutagênica dos óleos de macaúba e oliva.

O óleo da polpa de macaúba pode ser um substituto do azeite de oliva na alimentação humana, uma vez que não foram observados efeitos deletérios sobre o metabolismo mesmo sob condições de forte indução dislipidêmica.

Agradecimentos

À Universidade Católica Dom Bosco por disponibilizar a estrutura necessária para que fosse realizada esta pesquisa.

Ao programa de pós-graduação stricto sensu em biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco.

À Prof^a Dr^a Márcia Maria Silva, Patologista Clínica da Ultramedical Centro de Diagnósticos em Medicina, Campo Grande – MS.

À Farmacêutica Gabriella Ciconini, mestre em Biotecnologia pela Universidade Católica Dom Bosco pelas análises de cromatografia gasosa.

As mestres Brunna Mary Okubo e Danieli Fernanda Buccini pelos ensaios de Mutagênese.

Referências

1. HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. *Field Guide to the Palms of the Americas* New Jersey: Princeton University, 1995. p.166-167.
2. MOTTA, P.E.F.; CURI, N.; OLIVEIRA-FILHO, A.T.; GOMES, J.B.V. Ocorrência da macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. *Pesq. Agropec.Bras.*, v.37, n.7, p.1023-1031, 2002.
3. BHERING, L. Macaúba: Matéria - prima nativa com potencial para a produção de biodiesel. Disponível em: <<http://www.cnpae.embrapa.br/artigos-de-divulgacao/macauba-materia-prima-nativa-com-potencial-para-producao-de-biodiesel.pdf/view>>.Janeiro 2010. Acesso em: 09 de maio de 2011.
4. SILVA, J. C. Macaúba: fonte de matéria-prima para os setores alimentício, energético e industrial. Viçosa, 1994, 41 f. Trabalho de conclusão da disciplina Cultivo de Essências Exóticas e Nativas. Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa.
5. MOURA, E.L.; MOTOIKE, S.Y.; VENTRELLA, M.C.; SÁ JÚNIOR, A.Q.; CARVALHO, M. *Somatic embryogenesis in macaw palm (Acrocomia aculeata) from zygotic embryos*. *Scientia Horticulturae*, v.119, n.4, p.447-454, 2009.
6. FARIA, L. A. (2010). Hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba com lipase extracelular de *Colletotrichum gloesporioides* produzida por fermentação em substrato líquido. [Dissertação de Mestrado].
7. HIANE, P.A.; FILHO, M.M.R.; RAMOS, M.I.L.; MACEDO, M.L.R. Óleo da polpa e amêndoa de bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (jacq.) lodd. Caracterização e composição em ácido graxos. *Braz. J. Food Technol.*, v,8, n.3, p.256-259, 2005.
8. FITÓ, M.; GUXENS, M.; CORELLA, D. *Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial*. *Arch Intern Med.*, v.167, p.1195-203, 2007.
9. GRANADOS-PRINCIPAL, S.; QUILES, J.L.; RAMÍREZ-TORTOSA, C.L.; SÁNCHEZ-ROVIRA, P.; RAMÍREZ-TORTOSA, M.C. *Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials*. *Nutr Rev.*, v.68, p.191-206, 2010.
10. FARMER, J.A.; LIAO, J. Evolving Concepts of the Role of High-Density Lipoprotein in Protection from Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.*, v.13, p.107-114, 2011.
11. RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., KIMURA, M. & AMAYA-FARFAN, J. (2008). Fontes Brasileiras de carotenoides. Tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos. Brasília: MMA/SBF.

12. RAMOS M. I. L., SIQUEIRA, E. M. A., ISOMURA, C. C., BARBOSA, A. M. J., 7 ARRUDA, S. F. (2007). Bocaiúva (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood) improved vitamin A status in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22, 3186 – 3190.
13. CHAIYASIT, W., ELIAS, R. J., McCLEMENT, D. J., & DECKER, E. A. (2007). Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation, *Food Science and Nutrition*, 47, 299-317.
14. CARLUCCIO, M.A.; MASSARO, M.; SCODITTI, E.; DE CATERINA, R. *Vasculoprotective potential of olive oil components*. *Mol. Nutr. Food Res.*, v.51 p.1225-1234, 2007.
15. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources. Commission on Life Sciences. National Research Council. National Academy Press. Washington, D.C. 1996.
16. AOCS. (1993). *Official and tentative methods, American Oil Chemists' Society*. USA: Champaign, AOCS.
17. BRASIL. (2005). RDC 270, 2005. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC/ANVISA/MS nº 270 de 22 setembro de 2005. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras e creme vegetal. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília – DF. 23 de setembro de 2005
18. AOCS. (1995). *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society* (4 ed.) USA: Champaign, AOCS.
19. SILVA et al., 1999 SILVA, Francisco A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA M. A. Método para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Rev. Química Nova* v.22, n.1, p. 94-103, 1999.
20. SSOG, 1976 SSOG – *Stazione Sperimentale per Le Industrie degli Oli e dei Grassi, Norma Italiane pre il Controllo e Derivati*. Milano, 1976.
21. RODRIGUES-AMAYA, D. B., & KIMURA, M. (2004). *HarvestPlus Handbook for carotenoid analysis*. Washington, DC: International Food Policy Research Institute; Cali: International Center for Tropical Agriculture (Technical monograph 2).
22. BARRENTO, S. I. da S. P. M. (2010). *Nutricional quality and physiological responses to transport and storage of live crustaceans trated in Portugal*. Dissertação (Doutorado em ciência animal – Especialidade Nutrição). 261p. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto – Portugal.
23. ULBRICHT, T. L. V., & SOUTHGATE, D. A. T. (1991). *Coronary heart disease: seven dietary factors*. *Lancet*, 338, 985 – 992.

24. RAMOS FILHO, M. M., RAMOS, M. I. L., HIANE, P. A., SOUZA, E. M. T. (2010). Nutritional value of seven freshwater fish species from the Brazilian pantanal. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 87, 1461 – 1467
25. SANTOS-SILVA, J., BESSA, R. J. B., & SANTOS-SILVA, F. (2002). *Effect of genotype feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs. II. Fatty acid composition of meat*. *Livestock Production Science*, 77, 187 – 194.
26. ASSUNÇÃO M. L., FERREIRA H. S., SANTOS A. F., Cabral, C. R., FLORÊNCIO T. M. M. T. Effects of Dietary Coconut Oil on the Biochemical and Anthropometric Profiles of Women Presenting Abdominal Obesity (2007).
27. BENTES, A. de S., SOUZA, H. A. L. de, MENDONÇA, X. M. F. D., & SIMÕES, M. G. (2009). Caracterização física e química e perfil lipídico de três espécies de peixes amazônicos. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, 03, 97 – 108.
28. PAIVA, F. P.; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. Curso de Manipulação de animais de Laboratório. Organização: FIOCRUZ, Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. Salvador – BA / Maio – 2005.
29. HARNAFI, H.; BOUANANI, N. H.; AZIZ, M.; CAID, H. S.; GHALIM, N.; AMRANI, S. *The hypolipidaemic activity of aqueous Erica multi. ora flowers extract in Triton WR-1330 induced hyperlipidaemic rats: A comparison with fenofibrate*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.109, p. 156-160, 2007
30. JUNQUEIRA, L. C. U.; & CARNEIRO, J. *Histologia e Embriologia básica*, 2010. 10ª edição. Guanabara Koogan.
31. HEDDLE, J. A. Implications for genetic toxicology of the chromosomal breakage syndromes. *Mutat Res.* v.247, p. 221-229, 1991.
32. MORETTO, E.; FETT, R. *Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos*. São Paulo: Ed. UFSC, 1998.
33. ROVELLINI, P., CORTESI, N., & FERDELI, E. (1997). *Ossidazione Del lipid. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 74, 181-189.
34. FERRARI, R. A., & Souza, W. L., (2009). Avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel de óleo de girassol com antioxidantes. *Química Nova*, 32, 106-111.
35. PEIXOTO, E. R. M.; SANTANA, D. M. N.; ABRANTES, S. Avaliação dos índices de identidade e qualidade do azeite de oliva – Proposta para atualização da legislação brasileira. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* vol. 18 n. 4 Campinas Oct./Dec. 1998. *Food Science and Technology*.

36. RODRIGUES-AMAYA, D. B. (2002). Brazil: a bounty of carotenoid sources. *Sight and life Newsletter*, 4, 3-9.
37. JORGE, M. A.; AMARAL, F. P.; BROETTO, F.; BATSTELLA, B. C. (2011). Extração e caracterização qualitativa do óleo da polpa e amêndoas de frutos de macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. ex Mart] coletada na região de Botucatu, SP. *Revista Energia na Agricultura*.
38. AMARAL, F.P.; BROETTO, F.; BATISTELLA, C.B.; JORGE, S.M.A. Extração e caracterização qualitativa do óleo da polpa e amêndoas de frutos de Macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. ex Mart] coletada na região de Botucatu – SP. *Revista Energia na Agricultura*, v.26, n.1, p.12-20, 2011.
39. ROOYEN, J. V.; BESTER, D.; ESTERTHUYSE, A. J.; TRUTER, E. J. (2010). *Cardiovascular effects of edible oils: a comparison between four popular edible oils*. *Nutrition Research* .
40. PERONA, J. S.; Cañizares, J.; MONTERO, E.; Sánchez-Domínguez, J. M.; PACHECO, Y. M.; Ruiz-Gutierrez, V. (2004). *Dietary Virgin Olive Oil Triacylglycerols as an Independent Determinant of Very Low-Density Lipoprotein Composition From the Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Seville, Spain*. *applied Nutricional Investigation*.
41. PERONA, J. S.; FITÓ, M.; COVAS, M. I. GARCIA, M.; RUIZ-GUTIERREZ, V. (2011). Olive oil phenols modulate the triacylglycerol molecular species of human very low-density lipoprotein. A randomized, crossover, controlled trial. *Metabolism Clinical and Experimental*.
42. HUANG, C.L.; SUMPIO, B.E. Olive Oil, the Mediterranean Diet, and Cardiovascular Health. *J Am Coll Surg*, v.207, n.3, p.407-416, 2008.
43. TURAN, H., SONMEZ, G., & KAYA, Y. (2007). *Fatty acid profile and proximate composition of the thomback ray (Raja clavata), L 1758) from the Sinop coast in the Black Sea*. *Journal of Fisheries Science*, 01, 97 – 103.
44. SANTOS-SILVA, J., BESSA, R. J. B., & SANTOS-SILVA, F. (2002). *Effect of genotype feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs. II. Fatty acid composition of meat*. *Livestock Production Science*, 77, 187 – 194.
45. BASIRON, Y. (2005). Palm Oil. In: F. SHAHID (6 ed.), *Bailey's Industrial oil and fat products* (PP. 333-429). New York: Wiley-Interscience.
46. FIRESTONE, D. (2005). Olive Oil. In: F. SHAHIDI (6 ed.), *Bailey's Industrial oil and fat products*. (pp. 303-331). New York: Wiley-Interscience.

47. HAMMOND, E. G., LAWRENCE, A. J., SU, C., WANG, T., & WHITE, P. J. Soybean Oil. (2005). In: F. SHAHIDI (6 ed.), Bailey's Industrial oil and fat products. (pp. 577-653). New York: Wiley-Interscience.
48. TONIAL, I. B., OLIVEIRA, D. F. de, BRAVO, C. E. C., SOUZA, N. E. de, MATSUSHITA, M., & VISENTAINER, J. V. (2010). Caracterização físico-química e perfil lipídico do salmão (*Salmo salar* L.). Alimentos e Nutrição, 21, 93-98.
49. PEREZ-JIMENEZ, F.; RUANO, J.; Perez-Martinez, P.; Lopez-Segura, F.; Lopez-Miranda, J. (2007). The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. Review. Molecular Nutrition Food.
50. BINKOSK, A. E.; KRIS-ETHERTON, P. M.; WILSON, T. A.; MOUNTAIN, M. L.; NICOLOSI, R. J. (2005). Balance of Unsaturated Fatty Acids Is Important to a Cholesterol-Lowering Diet: Comparison of Mid-Oleic Sunflower Oil and Olive Oil on Cardiovascular Disease Risk Factors. Current Research.
51. NICOLOSIA, R. J.; WOOLFREYA, B.; WILSON, T. A.; SCOLLINA, P.; HANDELMANA, G.; FISHERB, R. (2004). *Decreased aortic early atherosclerosis and associated risk factors in hypercholesterolemic hamsters fed a high- or mid-oleic acid oil compared to a high-linoleic acid oil.* Journal of Nutritional Biochemistry.
52. LAURENTI, R.; BUCHALLA, C.M.; CARATIN, C.V.S. Doença do coração Internações, tempo de permanência e gastos. Brasil, 1993 a 1997. Ara BrasCardiol., v.74, n.6, p.483-487, 2000.
53. WHITE, B. Dietary Fatty Acids. Amer Fam Phys., v.80, n.4, p.345-350, 2009.
54. PERONA, J. S.; CABELLO-MORUNO, R.; RUIZ-GUTIERREZ, V. (2006). *The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function.* Reviews. Journal of Nutritional Biochemistry.
55. OBICI, S.; FENG, Z.; MORGAN, K.; STEIN, D. KARKANIAS, G.; ROSSETTI, L. Central Administration of Oleic Acid Inhibits Glucose Production and Food Intake. 2002.
56. SAMANE, S.; CHRISTONB, R.; DOMBROWSKIB, L.; TURCOTTED, S.; CHARROUF, Z.; LAVIGNEB C.; LEVY, E.; BACHELARD, H.; AMAROUCHC, A.; MARETTTEB, A.; HADDAD, P. S. (2009). *Fish oil and argan oil intake differently modulate insulin resistance and glucose intolerance in a rat model of dietary-induced obesity.* Metabolism Clinical and Experimental. Elsevier.
57. EVANGELISTA, C. M. W.; ANTUNES, L. M. G.; PIRES, M. L. B. *In vivo* cytogenetic effects of multiple doses of dietary vegetable oils. Genetics and Molecular Biology, Ribeirão Preto, v.29, n.4, p.730-734, 2006.

58. ROJAS-MOLINA, M.; CAMPOS-SÁNCHEZ, J.; ANALLA, M.; MUÑOZ-SERRANO, A.; ALONSO-MORAGA, Á. Genotoxicity of Vegetable Cooking Oils in the *Drosophila* Wing Spot Test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Córdoba, v.45, p.90-95, 2005.
59. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO (DOU), seção 1 de 30 de agosto de 2010. Instrução Normativa número 166 que aprova o Regulamento Técnico dos Azeites de Oliva e dos óleos de Bagaço de Oliva, definindo o seu padrão oficial de classificação, com os requisitos de Identidade e qualidade, a amostragem, o modo de apresentação e a marcação ou rotulagem, na forma de seus Anexos.
60. GOMEZ-PINÓL, J. M., & BORONAT, M. C. de la T. (1989). Influencia de La tecnologia em nutritivo de los alimentos: lípidos. *Alimentaria*, 204, 15-21.
61. WEISS, T. J. (1983). *Food oils and their uses*. (310p.) AVI Publishing Company, 2 ed.
62. PANAGIOTAKOS, D. B., DIMAKOPOULOU, K., KATSOUYANNI, K., BELLANDER, T., GRAU, M., KOENIG, W., LANKI, T., PISTELLI, R., SCHNEIDER, A., & PETERS, A. (2009). Mediterranean diet and inflammatory response in myocardial infarction survivors. *International Journal of Epidemiology*, 38, 856-866.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho indicaram a inocuidade do óleo de macaúba no metabolismo animal. Para avaliar possíveis efeitos benéficos, os experimentos devem ter maior duração e devem ser esquematizados incluindo-se o óleo na ração, tornando-a isocalórica.

NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA

Biochimie

Biochimie is an English language, multi-topical journal publishing original articles, short communications, as well as review articles in all areas of biology (enzymology, genetics, immunology, microbiology, structure of macromolecules, etc), provided that the approach adopted stems from biochemistry, biophysics or molecular biology.

Publication types Original Research articles Short communications Review articles and mini-reviews Hypotheses Letters to the Editor, commenting on papers published in *Biochimie*.



Before You Begin

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans*

<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EU Directive 2010/63/EU for animal experiments* http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm;

Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or

organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: *Before the accepted manuscript is published in an online issue*: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author

names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. *After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please

visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.



Preparation

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a

lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

- ***Present/permanent address.***

If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should have no more than 300 words.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for

examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Database linking

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below. Authors should explicitly mention the *database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article. Please use the following format: **Database ID: xxxx** Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):• ASTM: ASTM Standards Database (ASTM ID: G63)• CCDC: Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)• GenBank: Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) (GenBank ID: BA123456)• GEO: Gene Expression Omnibus (GEO ID: GSE27196; GEO ID: GPL5366; GEO ID: GSM9853)• MI: EMBL-EBI OLS Molecular Interaction Ontology (MI ID: 0218)• MINT: Molecular INTERactions database (MINT ID: 6166710)• NCBI Taxonomy: NCBI Taxonomy Browser (NCBI Taxonomy ID: 48184)• NCT: ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)• OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)• PDB: Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)• TAIR: The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020) UniProt: Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

Math formulae Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the

position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list. *Table footnotes* Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points • Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork. • Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font. • Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol. • Number the illustrations according to their sequence in the text. • Use a logical naming convention for your artwork files. • Provide captions to illustrations separately. • Produce images near to the desired size of the printed version. • Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'. TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not: • Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low; • Supply files that are too low in resolution; • Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted

article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation intext Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result' *List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text. *Examples:* Reference to a journal publication: [1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. Reference to a book: [2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000. Reference to a chapter in an edited book: [3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to

publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item. **Ensure that the following items are present:** One author has been designated as the corresponding author with contact details: • E-mail address • Full postal address • Telephone and fax numbers All necessary files have been uploaded, and contain: • Keywords • All figure captions • All tables (including title, description, footnotes) Further considerations • Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked' • References are in the correct format for this journal • All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa • Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web) • Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print • If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Additional information

Short Communications should be a maximum of 4 printed pages (approx. 2,500 words) maximum, including title, references, and only 2 figures or tables and will be rejected if submitted in excess of this length. Reports of new or improved methods should be as brief as is consistent with clarity (up to about 1,000 words). They should unequivocally identify the element of novelty claimed and the advantages over

existing technology. Performance characteristics, including effects of interfering substances, comparisons with results of accepted methods and reference values based on appropriate population samples should be documented by adequate data. Citing of earlier publications is preferred to repetition of details for reagents, procedures, etc., which are always in print. Nevertheless, the information provided must suffice to allow readers to duplicate the work or to compare the technique with current practice.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*): doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059 When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your

proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.



Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.