

BRUNA FONTANA THOMAZINI

**AVALIAÇÃO DO ÓLEO DE SACHA KIRUMA (*Plukenetia volubilis L.*) NO
DUODENO E FÍGADO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 E APO E^{-/-}.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

T465a
2011

Thomazini, Bruna Fontana, 1987-
Avaliação do óleo de sacha kiruma (*Plukenetia volubilis* L.)
no duodeno e fígado de camundongos C57BL/6 e APO E^{-/-} /
Bruna Fontana Thomazini. -- Viçosa, MG, 2011.
xiv, 71f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 61-71.

1. *Plukenetia volubilis*. 2. Intestino delgado. 3. Fígado.
4. Morfologia. 5. Ácidos graxos. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 583.69

BRUNA FONTANA THOMAZINI

**AVALIAÇÃO DO ÓLEO DE SACHA KIRUMA (*Plukenetia volubilis L.*) NO
DUODENO E FÍGADO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 E APO E^{-/-}.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 16 de setembro de 2011.

Maria do Carmo Gouveia Peluzio

Sirlene Souza Rodrigues Sartori

Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado
(Orientadora)

Aos meus pais e ao meu irmão.

Amo Vocês!

*“ E voltou, então, à raposa:
– Adeus... – disse ele.
– Adeus – disse a raposa. – Eis o meu segredo. É muito simples: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos.
– O essencial é invisível aos olhos – repetiu o príncipezinho, para não se esquecer.
– Foi o tempo que perdeste com a tua rosa que a fez tão importante.
– Foi o tempo que perdi com a minha rosa... – repetiu ele, para não se esquecer.
– Os homens esqueceram essa verdade – disse ainda a raposa. – Mas tu não a deves esquecer. Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas. Tu és responsável pela tua rosa...
– Eu sou responsável pela minha rosa... – repetiu o príncipezinho, para não se esquecer.”*

Da obra “O Pequeno Príncipe”, de Antoine de Saint- Exupéry.

AGRADECIMENTOS

“Dai graças ao Senhor porque ele é bom, eterna é sua misericórdia” (Sal 117, 29).

Aos meus pais, Aldejair e Creuza, e ao meu irmão, Willian, por fazerem tudo possível. Pelo apoio incondicional e pela torcida sem fim. Amo vocês!

A minha família que, mesmo com a distância estiveram sempre torcendo. Grata pelas orações e pelo incentivo.

A Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos do Programa REUNI.

A Prof^ª Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado pelo exemplo de profissionalismo, pela orientação e confiança depositada em mim.

A Prof^ª Maria do Carmo Gouveia Peluzio (DNS/UFV) pelo profissionalismo, contribuição e por ceder gentilmente os animais utilizados neste estudo e o laboratório para as análises.

Ao Prof^º Eduardo Euclides de Lima e Borges (DEF/UFV) pela colaboração e por disponibilizar toda a estrutura para a extração do óleo.

A Prof^ª Luzimar Campos da Silva (DBV/UFV) por disponibilizar o uso do fotomicroscópio.

A Prof^ª Ana Vlândia Bandeira Moreira (DNS/UFV) por disponibilizar o uso do cromatógrafo gasoso e pela valiosa ajuda nas análises.

Ao Prof. Clóvis Andrade Neves, chefe do Departamento de Biologia Geral, que me deu grande apoio no início da realização deste trabalho, e que agora na etapa final aceitou o convite para ser membro suplente na banca examinadora deste trabalho. Grata pela disponibilidade e ajuda em todo momento em que foi procurado.

As professoras Maria do Carmo Gouveia Peluzio e Sirlene Souza Rodrigues Sartori por aceitarem fazer parte da banca examinadora deste trabalho.

Ao professor Sérgio Luis Pinto da Matta (Super Sérgio!) por aceitar fazer parte da banca examinadora deste trabalho como professor suplente. Grata ainda pelo incentivo, recepção e ajuda ao longo de todos estes anos.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pelo exemplo de profissionalismo, pela disponibilidade em ajudar e pelo aprendizado ao longo do curso.

Aos Departamentos de Biologia Geral, Engenharia Florestal, Nutrição e Saúde por cederem o espaço e materiais necessários para o desenvolvimento do trabalho.

Aos camundongos.

Aos amigos Cynthia, Eduardo, Kyvia, Marli, Suellen e Vitor, e as professoras Izabel e Maria do Carmo pela ajuda no dia do sacrifício.

Ao Alex de Freitas Bhering Cardoso, técnico do Laboratório de Biologia Estrutural e Histofisiologia Reprodutiva e Digestiva. Grata por toda a ajuda e pela paciência!

A Elizabeth Alves Pena, a Beth, secretária do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. Grata por toda a ajuda e paciência e por não nos deixar ficar perdidos em meio a tantas datas importantes e prazos.

Ao Eduardo França Castro pela parceria e companhia. Pelas caronas e pela ajuda ao longo dos últimos 12 meses.

Ao José Mauro Ferreira (DEF/UFV), técnico do Laboratório de Sementes, pelas sugestões e auxílio na extração do óleo.

Ao Sr. Toninho, técnico do Laboratório de Bioquímica Nutricional por toda a ajuda e disponibilidade.

Ao aluno de iniciação científica Vítor Maurício pela ajuda na manutenção dos animais.

A aluna de iniciação científica Camila pela ajuda com as análises no cromatógrafo gasoso.

As mestres Cynthia e Natália pela ajuda na extração dos lipídeos e a Damiana, sempre disponível para esclarecer as dúvidas.

A Suellen pela ajuda nas análises histomorfométricas.

A Daiane pelos inúmeros momentos em que me socorreu no laboratório!

Aos amigos do Laboratório de Biologia Estrutural e Histofisiologia Reprodutiva e Digestiva, pelos momentos de distração, trabalho, sufoco e ajuda!

Aos amigos do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, grata pela companhia e pelos bons momentos.

As amigas Daiane, Marli e Suellen! Obrigada por tudo!

As companheiras de república, Carla, Nathalia e Renata, por contribuir para que Viçosa se tornasse um segundo lar.

Aos Bidesagradáveis! Por todos os momentos maravilhosos e divertidos ao longo destes anos em Viçosa.

Aos amigos que Viçosa me permitiu conhecer.

As amigas Izabela e Renata pelo incentivo, pelas risadas, pela companhia, torcida e presença.

A todos que direta ou indiretamente participaram para que tudo fosse possível. O meu sincero... Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

Bruna Fontana Thomazini, filha de Aldejair José Thomazini e Creuza Maria Fontana Thomazini, nasceu em Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, em 22 de setembro de 1987. Em março de 2005 iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se como Bacharela e Licenciada em julho de 2009. Durante a graduação foi monitora nas disciplinas de Citologia, Histologia e Embriologia e estagiária do Laboratório de Biologia Estrutural e Histofisiologia Reprodutiva e Digestiva. Em agosto de 2009 iniciou o curso de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Federal de Viçosa, apresentando a dissertação em 16 de setembro de 2011.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
Introdução	1
Referencial teórico	3
1. <i>Plukenetia volubilis</i> Linneo	3
1.1. Características Botânicas	3
1.2. Composição química das sementes e do óleo de sacha kiruma	4
2. Métodos de extração de óleos vegetais	5
2.1. Extração por prensagem a frio	5
2.2. Hidrodestilação	6
2.3. Extração supercrítica	6
2.4. Extração com solvente orgânico	6
3. As lipoproteínas	7
4. Os ácidos graxos poliinsaturados: metabolismo e importância	8
5. O modelo animal	11
6. O intestino delgado	12
6.1. O epitélio do intestino delgado	13
6.2. Duodeno: caracterização e absorção de lipídeos	15
7. Fígado: estrutura e função	17
7.1. Hepatócitos e o metabolismo dos lipídeos	18
Objetivos	20
1. Objetivos gerais	20
2. Objetivos específicos	20
Metodologia	21
1. Obtenção do óleo	21
1.1. Sementes	21
1.2. Moagem das sementes	21
1.3. Extração do óleo de sacha kiruma	21
2. Eficiência do processo de extração	22

3.	Obtenção dos ésteres de ácidos graxos do óleo de sacha kiruma _____	22
3.1.	Avaliação do perfil lipídico do óleo de sacha kiruma utilizando a cromatografia gasosa _____	22
4.	Ensaio biológico _____	23
4.1.	Origem e manutenção dos animais _____	23
4.2.	Dieta com o óleo de sacha kiruma _____	24
4.3.	Desenvolvimento dos animais _____	25
4.4.	Eutanásia _____	25
5.	Avaliação dos efeitos do tratamento no duodeno _____	25
5.1.	Obtenção dos fragmentos do duodeno _____	25
5.2.	Microtomia, Coloração e Histoquímica _____	26
5.3.	Captura de imagens _____	26
5.4.	Análise histomorfométrica _____	27
6.	Avaliações dos efeitos do tratamento no fígado _____	28
6.1.	Obtenção dos fragmentos de fígado _____	28
6.2.	Microtomia e Coloração _____	28
6.3.	Captura de imagens _____	28
6.4.	Análise histomorfométrica _____	29
7.	Análise Estatística _____	29
8.	Interpretação dos resultados _____	29
	Resultados _____	30
	Extração e avaliação do óleo das sementes de sacha kiruma _____	30
1.	Rendimento da extração de óleo _____	30
2.	Perfil de ácidos graxos do óleo de sacha kiruma _____	30
3.	Relação de ácidos graxos poliinsaturados/saturados no óleo _____	32
	Ensaio Biológico _____	33
1.	Consumo alimentar _____	33
2.	Evolução ponderal _____	34
3.	Variação da massa corporal, consumo alimentar e índice hepatossomático _____	34
	Avaliação histomorfométrica do duodeno _____	36
1.	Morfologia do duodeno _____	36
2.	Morfometria dos vilos _____	36
3.	Superfície de absorção _____	36

4. Morfometria da mucosa _____	37
5. Morfometria da túnica muscular _____	37
6. Morfometria da cripta de Lieberkühn _____	38
7. Linfócitos intraepiteliais e enterócitos _____	38
8. Quantificação das células caliciformes e células de Paneth por mm ² de mucosa _____	39
Avaliação histomorfométrica do fígado _____	44
1. Morfologia do fígado _____	44
2. Morfometria dos hepatócitos _____	44
3. Morfometria de outros componentes do fígado _____	44
4. Diâmetro celular e nuclear de hepatócitos _____	45
Discussão dos resultados _____	48
1. Extração e avaliação do óleo de sacha kiruma _____	48
2. Evolução do consumo alimentar e massa corporal dos camundongos durante o ensaio biológico _____	49
3. Avaliação dos efeitos do tratamento no duodeno _____	49
4. Avaliação dos efeitos do tratamento no fígado _____	52
Conclusões _____	54
Anexos _____	55
Preparo de Soluções _____	58
Referências _____	61

LISTA DE ABREVIATURAS

- AB⁺-Célula caliciforme marcada apenas pelo Azul de Alcian pH2,5, produtoras de mucina ácida não sulfatada ou sialomucina, caracterizada pela coloração azulada
- AB⁺PAS⁺-Célula caliciforme marcada simultaneamente pelo Azul de Alcian e Reativo de Schiff, produz e secreta ambos tipos de mucina, neutra e ácida, caracterizada por uma coloração que varia do púrpura ao violeta
- ACF- Grupo com 5 animais Apo-E -/-; dieta controle, fêmeas
- ACM- Grupo com 5 animais Apo-E -/-; dieta controle, machos
- Apo-E- Apoproteína E
- Apo-E ^{-/-}- Camundongo da linhagem BlackC57/6 *knockout* para o gene da apolipoproteína E
- ATF- Grupo com 5 animais Apo-E -/-; dieta tratada com o óleo de sacha kiruma, fêmeas
- ATM- Grupo com 5 animais Apo-E -/-; dieta tratada com o óleo de sacha kiruma, machos
- BCF- Grupo com 5 animais BlackC57/6 selvagem; dieta controle, fêmeas
- BCM- Grupo com 5 animais BlackC57/6 selvagem; dieta controle, machos
- BlackC57/6- Camundongo da linhagem BlackC57/6 normal
- BTF- Grupo com 5 animais BlackC57/6 selvagem; dieta tratada com o óleo de sacha kiruma, fêmeas
- BTM- Grupo com 5 animais BlackC57/6 selvagem; dieta tratada com o óleo de sacha kiruma,, machos
- HDL- Lipoproteínas de densidade alta
- IDL- Lipoproteínas de densidade intermediária
- LDL- Lipoproteínas de densidade baixa
- PAS⁺-Célula caliciforme marcada apenas pelo Reativo de Schiff, produtoras de mucina neutra, caracterizada pela coloração azulada
- QM- Quilomícrons
- VLDL- Lipoproteínas de densidade muito baixa
- ω-3- Ômega três, família de ácidos graxos essenciais
- ω-6- Ômega seis, família de ácidos graxos essenciais
- ω-9- Ômega nove, família de ácidos graxos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Planta de sacha kiruma com frutos imaturos e maduros - (Janeiro de 2010). ...	4
Figura 2: Semente de sacha kiruma - (Setembro de 2011).	4
Figura 3: Atuação da Apo-E. Adaptado de Pendse et al. (2009).	8
Figura 4: Estrutura química dos principais ácidos graxos da família ω -3 (MOREIRA, 2006).	9
Figura 5: Metabolismo dos ácidos graxos das famílias ω -3 (n-3) e ω -6 (n-6) (Adaptado de PERINI et al., 2010).	10
Figura 6: Desenho esquemático da organização da parede do tubo digestivo (Adaptado de GARTNER & HIATT, 2002).	12
Figura 7: Diagrama esquemático da mucosa, vilos, criptas de Lieberkühn, e componentes celulares do intestino delgado de humanos (Adaptado de GARTNER & HIATT, 2002).	15
Figura 8: Diagrama esquemático da cripta de Lieberkühn (a), do ápice do vilos (b) e dos componentes celulares do intestino delgado de humanos (Adaptado de JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).	15
Figura 9: Absorção de lipídeos no intestino delgado (Adaptado de GARTNER & HIATT, 2002).	17
Figura 10: Desenho esquemático do fígado.(Adaptado de GARTNER & HIATT, 2002).	18
Figura 11: Consumo alimentar dos grupos tratados, controles e consumo geral ao longo do tratamento.	33
Figura 12: Evolução ponderal dos camundongos ao longo das quinzenas (Q).	34
Figura 13: Secção transversal do duodeno com destaque para o vilos, cripta, mucosa e túnica muscular Azul de Toluidina Borato de Sódio 1%	40
Figura 14: Secção transversal do duodeno. Técnica combinada de Azul de Alcian e PAS.	41
Figura 15: Secções transversais do duodeno representando os oito tratamentos. Azul de Toluidina Borato de Sódio 1%. Barra: 100 μ m.	42
Figura 16: Secções transversais do duodeno representando os oito tratamentos. Técnica combinada de Azul de Alcian e PAS. Barra: 50 μ m.	43
Figura 17: Secção transversal do fígado. Hematoxilina- Eosina. Barra: 50 μ m.	46
Figura 18: Secções do fígado representando os oito tratamentos. Hematoxilina- Eosina. Barra: 50 μ m.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição em ácidos graxos do óleo de sacha kiruma extraído com hexano, segundo Hamaker et al. (1992)	5
Tabela 2: Caracterização dos grupos experimentais.	24
Tabela 3: Formulação das dietas controle e experimental. Em acordo com determinações AIN-93G formulada para roedores em fase de crescimento, gestação e lactação.....	25
Tabela 4: Combinação de grupos utilizada para a interpretação dos resultados.....	29
Tabela 5: Rendimento das seis baterias de extração do óleo de sacha kiruma.	30
Tabela 6: Ácidos graxos (% de área) do óleo extraído das sementes de sacha kiruma. .	31
Tabela 7: Principais ácidos graxos encontrados no óleo de sacha kiruma e a relação poliinsaturados/saturados.	32
Tabela 8: Dados de massa corporal, consumo alimentar e índice hepatossomático.....	35
Tabela 9: Dados da morfometria dos vilos do duodeno.....	36
Tabela 10: Morfometria da superfície de absorção do duodeno.	37
Tabela 11: Morfometria da mucosa do duodeno.....	37
Tabela 12: Morfometria das camadas musculares do duodeno.	38
Tabela 13: Morfometria da cripta de Lieberkühn no duodeno.	38
Tabela 14: Frequência de enterócitos e linfócitos intraepiteliais no duodeno.	39
Tabela 15: Tipos celulares secretores e célula de Paneth por mm ² de mucosa no duodeno.	39
Tabela 16: Quantificação dos componentes celulares no fígado.	44
Tabela 17: Frequência dos componentes intercelulares no fígado.....	45
Tabela 18: Diâmetros nuclear e celular dos hepatócitos.....	45

RESUMO

THOMAZINI, Bruna Fontana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Setembro de 2011. **Avaliação do óleo de sacha kiruma (*Plukenetia volubilis L.*) no duodeno e fígado de camundongos C57BL/6 e APO E^{-/-}**. Orientadora: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado.

Sacha kiruma (*Plukenetia volubilis L.*) é uma planta oleaginosa nativa da Amazônia Peruana. O óleo extraído de suas sementes é muito rico em ácidos graxos poliinsaturados, diretamente relacionados à prevenção de doenças cardiovasculares, dentre elas, a aterosclerose. Para seu transporte, os lipídeos formam complexos com proteínas, as apoproteínas. A apoproteína E (Apo-E) é sintetizada principalmente no fígado e no intestino e se relaciona com a absorção celular de quilomícrons ricos em triglicérides remanescentes e VLDL. A produção de animais *knockout* para o gene da apoproteína E apresenta como principal característica o rápido e espontâneo aparecimento de lesões ateroscleróticas nas artérias, similares às aquelas encontradas em humanos. O intestino delgado é o sítio de absorção de componentes da dieta, dentre eles os lipídeos, enquanto o fígado apresenta-se como o sítio de modificação e/ou armazenamento de compostos. Os objetivos foram extrair o óleo de sementes de sacha kiruma por meio de método químico (hexano), determinar o perfil de ácidos graxos e avaliar os efeitos desse óleo na estrutura do duodeno e fígado de camundongos Apo-E^{-/-} e selvagens BlackC56/7. Os resultados da avaliação do óleo extraído para este estudo indica percentual de ácidos graxos similar ao citado na literatura. Entre os tratamentos não foram encontradas alterações no duodeno com relação à superfície de absorção, morfometria de cripta e espessura das camadas musculares e da mucosa. Com relação à altura do epitélio absorptivo, os animais *knockout* do grupo controle apresentaram maior média se comparados com os grupos *knockout* tratados com o óleo. A frequência de enterócitos, linfócitos, células caliciformes e células de Paneth não sofreram alterações devido ao tratamento proposto. Em relação às células caliciformes AB⁺PAS⁺, foi observada maior frequência nos grupos selvagens tratados com óleo de sacha kiruma em relação aos controles. No fígado também não foram encontradas diferenças devido ao tratamento na frequência dos componentes hepáticos, nem na relação de diâmetro do citoplasma/ diâmetro do núcleo dos hepatócitos. Com isso, concluiu-se que o método de extração com hexano mostrou ser eficiente na extração de óleo das sementes de sacha kiruma. Este óleo apresentou composição lipídica similar daquela descrita na literatura, mantendo suas propriedades terapêuticas. O ensaio não mostrou indícios de que a dieta com o óleo de sacha kiruma possa ter alterado a estrutura histológica no duodeno ou fígado dos camundongos.

ABSTRACT

THOMAZINI, Bruna Fontana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa. September, 2011. **Evaluation of the effects of sacha kiruma oil (*Plukenetia volubilis* L.) in the duodenum and liver in C57BL/6 and APO E -/- mice.** Advisor: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado.

Sacha kiruma (*Plukenetia volubilis* L.) is an oleaginous native plant of the Peruvian Amazon. The oil extracted from its seeds is very rich in polyunsaturated fatty acids, directly related to the prevention of cardiovascular diseases, among them, the atherosclerosis. For transportation, lipids form complexes with proteins, the apoproteins. The apoprotein E (Apo E) is mainly synthesized in the liver and intestine and is related to the cellular uptake of triglyceride-rich chylomicrons and VLDL remnants. The production of knockout animals for the apoprotein E gene presents as main characteristic the rapid and spontaneous development of atherosclerosis lesions in the arteries, similar to those found in humans. The small intestine is the site of absorption of dietary components, including lipids, while the liver is the site of modification and/or storage of compounds. The objectives were to extract sacha kiruma seeds' oil by chemical method (hexane) and determine the acid profile. Also evaluate the histological structure of the duodenum and the liver of Apo E-/- mice and wild BlackC57/6 after the treatment with this oil. The evaluation of the oil extracted in this study indicates the percentage of polyunsaturated fatty acids similar to that found in the literature. There were no histological changes due to the treatment in the duodenum, with regard to the surface absorption, morphology of the crypt and the thickness of muscle layers and mucosa. With respect to the height of the absorptive epithelium, the control animals have high average compared with animals treated with the oil. The frequency of enterocytes, lymphocytes, goblet cells and Paneth cells did not change due to the proposed treatment. In relation to the goblet cell AB⁺PAS⁺ was observed more frequently in the groups of BlackC57/6 mice treated with the sacha kiruma's oil compared to control groups. In the liver were not found differences due to the treatment in the frequency of liver components or the ratio cytoplasm/ nucleus of the liver cells. The solvent extraction method was efficient in extracting oil from sacha kiruma's seeds. The oil showed similar lipid composition from the described in the literature. The test showed no evidence that the diet with sacha kiruma oil may have altered the histological structure of the duodenum and liver of mice Apo E -/- or wild BlackC57/6.

Introdução

Sacha kiruma (*Plukenetia volubilis* Linneo), é uma planta nativa do Peru, que foi descrita em 1753 pelo naturalista Linneo. A espécie também ocorre no norte do Brasil e em outros países que formam o complexo amazônico, sendo conhecida por várias denominações, dentre elas, sacha inchi, mani do inca, amendoim selvagem, amêndoa-lopo, amendoim inca, amendoim da montanha e amui (CIED, 2007; GUILLÉN et al., 2003; HUAMANÍ & FLORES, 2009). De acordo com Huamaní & Flores (2009) o óleo extraído das sementes de sacha kiruma tem elevada concentração de ácidos graxos poliinsaturados: 48,60% de ácido α -linolênico (ω -3, ômega 3); 36,80% de ácido α -linoléico (ω -6, ômega 6) e 8,28% de ácido oléico (ω -9, ômega 9). O óleo também contém ácidos graxos saturados, dentre eles ácido palmítico (3,85%) e ácido esteárico (3,85%) (HUAMANÍ & FLORES, 2009).

Os ácidos graxos da família ω -3 são conhecidos por vários benefícios à saúde, dentre eles a redução de triglicerídeo e colesterol sérico, efeitos antiinflamatórios e retardo do crescimento de tumores (TSUKUI et al., 2009; ZHANG et al., 2010). Em estudo realizado com humanos verificou-se que o consumo do óleo de sacha kiruma reduz a trigliceridemia posprandial (HUAMÁN et al., 2008). Os mecanismos de ação dos ácidos graxos poliinsaturados para diminuir a quantidade de lipídeos plasmáticos são múltiplos: redução da síntese de triglicerídeos e da secreção de VLDL, aumento da β -oxidação dos ácidos graxos no fígado, aumento da depuração dos quilomícrons e triglicerídeos por incremento da atividade da lipase lipoprotéica (HUAMÁN et al., 2008). Por outro lado, os ácidos graxos ω -6, principalmente os ácidos graxos linoléico e araquidônico, possuem efeitos proinflamatórios. A concentração equilibrada destes ácidos graxos possui efeito crucial no processo inflamatório (ZHANG, 2010). A relação desejada desses ácidos graxos na dieta é de 4:1 de ω -6 em relação a ω -3 (PEREIRA, 2009; SOUZA & VISENTAINER, 2006). Os ácidos graxos são constituídos por cadeias hidrocarbonadas ácidas de comprimento entre quatro e 36 carbonos (C4 a C36), sendo que os mais frequentes na natureza contêm números pares de átomos de carbono, de 12 a 24, em cadeias não ramificadas. (GAZZINELLI et al., 2010).

Por serem insolúveis em meio aquoso, os lipídeos formam complexos com proteínas, as apoproteínas, as quais possibilitam seu transporte. A apoproteína E (Apo-E) foi inicialmente identificada como um componente das partículas de lipoproteína rica em triglicerídeos. Apo-E é conhecida por facilitar a remoção de partículas remanescentes hepáticas de quilomícrons ricos em colesterol, e também agindo como ligante de algumas partículas de lipoproteínas para o receptor de LDL. Embora o fígado apresenta-se como o maior local de síntese de Apo-E, uma grande variedade de tecidos periféricos também expressam essa proteína. Tecidos esteroideogênicos, em particular, expressam altos níveis de Apo-E. A glândula adrenal de humanos e macacos, por exemplo, sintetizam Apo-E numa taxa similar ou mesmo maior do que o fígado (PRACK, 1991).

O camundongo *knockout* para o gene da apoproteína E (Apo-E $-/-$) é um dos modelos mais utilizados na pesquisa para o estudo do desenvolvimento espontâneo de lesões ateroscleróticas (ZADELAAR et al., 2007). A aterosclerose é uma doença multifatorial que pode ser modulada com a dieta e com a condição de

estresse/antioxidante na célula (WANG et al., 2004). É uma doença do sistema cardiovascular que causa o estreitamento das artérias ou à sua completa obstrução. Trata-se de um processo complexo que envolve disfunção endotelial, depósito de lipídios e reação inflamatória na parede vascular. A modificação da LDL por meio da oxidação possui papel importante no desenvolvimento da aterosclerose. Os ácidos graxos poliinsaturados obtidos pela dieta são incorporados em lipoproteínas, afetando potencialmente a susceptibilidade de oxidação da LDL, representando um efeito preventivo contra a doença (WANG et al., 2004).

A mucosa intestinal de mamíferos é um dos tecidos que se renovam mais rapidamente e a dinâmica da renovação celular é um ponto chave na diferenciação e conseqüentemente, no número de células absorptivas ou enterócitos nos vilos (CARUSO & DEMONTE, 2005; GARCÍA-MIRANDA, 2010). A unidade funcional básica do intestino é a cripta-vilo. Os enterócitos proliferam na cripta ou glândula intestinal e migram em direção ao ápice dos vilos onde são descartados no final da sua vida útil. Em geral, cada vilo é suprido de células provenientes de três criptas, embora isso varie entre as espécies animais. Nos ratos, esse ciclo proliferativo completo é de um dia e o tempo de vida das células nos vilos é de dois dias. Em seres humanos, o tempo de migração da célula até atingir o topo do vilo e ser descartada é de 48-72 horas. A taxa de reprodução das células na cripta e a proporção de migração desses enterócitos são alteradas em vários estados fisiológicos ou patológicos. Essas mudanças na dinâmica celular determinam nos enterócitos do vilo, por exemplo, alteração na atividade transportadora relacionada ao tempo de vida. Como outro exemplo, relatou-se que em ratos submetidos a jejum de quatro dias, há significativo decréscimo na taxa de reprodução das células da cripta. Desse modo, a absorção pode se alterar como resultado da variação da área de superfície total da mucosa (CARUSO & DEMONTE, 2005).

Enquanto no intestino delgado ocorre absorção dos nutrientes, o fígado é responsável pelos processos de desintoxicação e biotransformação. Pela sua exposição a estas substâncias, o fígado é um órgão muito suscetível a lesões (ALVARADO-RICO, 2010).

Considerando que o óleo de sacha kiruma tem potencial para utilização na indústria alimentar e farmacêutica, o objetivo deste trabalho foi extrair o óleo das sementes de sacha kiruma pelo método de extração com hexano; determinar a composição de ácidos graxos nesse óleo, e avaliar os efeitos desse produto na estrutura histológica do duodeno e do fígado de camundongos selvagens e deficientes para apoproteína E.

Referencial teórico

1. *Plukenetia volubilis* Linneo

Sacha kiruma (*Plukenetia volubilis* Linneo) é originária da Amazônia peruana, sendo conhecida no complexo regional Amazônico do Brasil pelo nome de amêndoa-lopo. Segundo estudos arqueológicos, há indícios de que as civilizações pré-inca e inca utilizavam as sementes de sachá kiruma na alimentação (CIED, 2007). É um arbusto perene, hermafrodita, e pertencente à família Euphorbiaceae (CIED, 2007), que reúne aproximadamente 7.500 espécies, distribuídas em todo o mundo principalmente nas regiões tropicais, em altitudes entre 200 e 1500m (GUILLÉN et al., 2003).

Os nativos da Amazônia obtêm farinha e óleo das sementes de sachá kiruma, subprodutos que são utilizados na preparação de diferentes alimentos e bebidas. No entanto, esta planta tem sido pouco estudada, e sua importância do ponto de vista nutricional e funcional é ainda assunto de pesquisa. Hamaker et al. (1992), em trabalho pioneiro, determinaram a composição de suas sementes, encontrando 35-60% de lipídeos e 27% de proteínas ricas em cisteína, tirosina, treonina e triptofano.

1.1. Características Botânicas

Na família Euphorbiaceae estão espécies importantes sob o aspecto econômico, destacando-se a seringueira, a mamona e a mandioca (JOLY, 1976). O gênero *Plukenetia* L. possui 16 espécies conhecidas (GILLESPIE, 1994), 11 de ocorrência na região neotropical, quatro na África e em Madagascar, e uma na Ásia (BUSSMANN et al, 2009). Todas as espécies neotropicais do gênero são cipós ou lianas, e a maioria ocorre em floresta tropical úmida. Sachá kiruma é encontrada principalmente a partir do nível do mar até cerca de 1000 a 1500m de altitude (BUSSMANN et al., 2009).

Exemplares de sachá kiruma atingem altura média de dois metros e necessitam do apoio de estacas para se desenvolver adequadamente (CIED, 2007). Os frutos são em forma de cápsulas de 30-50 mm de diâmetro, de cor verde intensa (Figura 1a), porém quando amadurecem apresentam coloração marrom escura (Figura 1b). Os frutos geralmente têm quatro lóbulos, mas existem aqueles com cinco a sete. As sementes (Figura 2) são de forma lenticular e se encontram dentro dos lóbulos das cápsulas, medindo de 15 a 20 mm de largura por 7 a 8 mm de espessura. O peso de cada semente varia de 0,8 a 1,4g com 33 a 35% de casca e 65 a 67% da amêndoa (CAI, 2011, FOLLEGATTI ROMERO, 2007).

Os frutos ficam maduros quando a planta atinge a idade de sete a oito meses de estabelecimento no campo. Após a primeira colheita, a planta não deixa de produzir e o intervalo entre colheitas é em torno de 20 a 25 dias, por até 10 anos (CÉSPEDES, 2006).

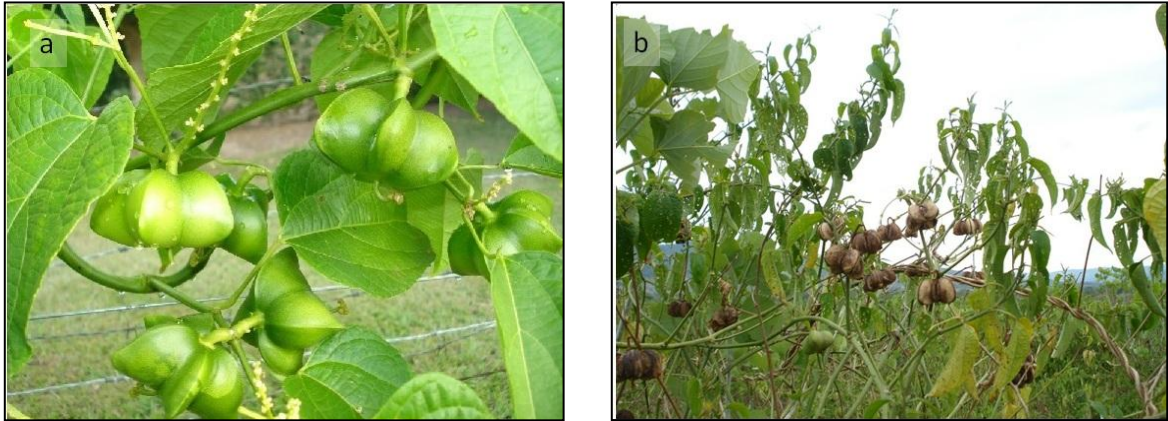


Figura 1: Planta de sacha kiruma com frutos imaturos (a) e maduros (b) - (Janeiro de 2010).



Figura 2: Semente de sacha kiruma - (Setembro de 2011).

1.2. Composição química das sementes e do óleo de sacha kiruma

O perfil de aminoácidos e ácidos graxos das sementes de sacha kiruma foi determinado por Hamaker et al. (1992). O conteúdo protéico das sementes foi aproximadamente o mesmo encontrado em outras oleaginosas da região dos Andes e o conteúdo protéico da farinha livre de lipídeos foi aproximadamente 53%. O perfil de aminoácidos foi comparado com o de outras oleaginosas. Os autores encontraram níveis de leucina e lisina menores em relação à proteína de soja, enquanto foi igual ou superior aos níveis de sementes de amendoim, algodão e girassol. Considerando o conteúdo sulfúrico (metionina + cisteína), a quantidade de tirosina, treonina e triptofano, Hamaker et al. (1992) perceberam que estes aminoácidos estavam presentes em maior quantidade nas sementes de sacha kiruma, enquanto que o conteúdo de fenilalanina foi relativamente menor. Comparado com as doses destes aminoácidos recomendadas pela FAO/WHO/UNU (Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation 1985, apud Hamaker et al. 1992) para crianças com idade entre dois e cinco anos, o conteúdo protéico de sacha kiruma, se completamente digerido, seria deficiente apenas em leucina e lisina (HAMAKER et al., 1992).

Hamaker et al. (1992) também analisaram a composição do óleo de sementes de sacha kiruma, extraído com hexano, revelando um total de ácidos graxos insaturados equivalente a

91,6%, dos quais o ácido linolênico representa 45,2% seguido do ácido linoléico com 36,80% (Tabela 1).

Tabela 1: Composição em ácidos graxos do óleo de sacha kiruma extraído com hexano, segundo Hamaker et al. (1992)

Ácidos graxos	Porcentagem (%)
Saturados	
Palmítico (C16:0)	4,5
Estearico (C18:0)	3,2
Insaturados	
Oléico (C18:1)	9,6
Linoléico (C18:2)	36,8
Linolênico (C18:3)	45,2
Resumo	
Saturados	7,7
Monoinsaturados	9,6
Poliinsaturados	82,0

Hamaker et al. (1992) comparando sacha kiruma com soja, amendoim, algodão e girassol, mostraram que as sementes de sacha kiruma possuem maior teor lipídico na semente (HAMAKER et al., 1992). Guillén et al. (2003) compararam o óleo de sacha kiruma com o de linhaça e verificaram que o óleo de linhaça possui mais oléico (monoinsaturado) enquanto o óleo de sacha kiruma possui mais linoléico (diinsaturado).

O óleo de sacha kiruma, por apresentar alta concentração de poliinsaturados, poderia ser bastante instável à oxidação, produzindo sabores e odores desagradáveis. Entretanto, estudos preliminares no Peru mostraram que o óleo de sacha kiruma não refinado parece ser relativamente estável (HAMAKER et al., 1992). Os resultados obtidos por Follegatti Romero (2007) mostraram um elevado teor de tocoferóis, o que possibilita a estabilização deste óleo.

2. Métodos de extração de óleos vegetais

Os métodos de extração empregados no passado eram bem simplificados e os produtos obtidos a partir destes nem sempre eram óleos 100% puros. As características de um óleo podem mudar conforme o método empregado, tendo em vista que as suas propriedades químicas poderão ser totalmente alteradas a depender das condições a qual ele é submetido quando determinada técnica é utilizada (PEREIRA, 2009).

2.1. Extração por prensagem a frio

A prensagem é um método comumente empregado para obtenção dos óleos vegetais. São prensas de alta pressão e bastantes flexíveis para operar com diferentes tipos de oleaginosas. Um aspecto negativo deste processo é que pode restar um residual de óleo na torta. Existe também o processo denominado misto que se refere à combinação do sistema de prensagem com o sistema de extração por solvente. Esse

processo pode ser utilizado em larga escala e também ser adaptado para vários tipos de oleaginosas (PEREIRA, 2009).

2.2. Hidrodestilação

A destilação é um processo de separação de misturas líquidas baseado na diferença de composições dos constituintes na fase líquida e vapor em equilíbrio, devido à diferença de volatilidade entre os componentes do líquido. Existem três formas de se expressar a hidrodestilação: destilação com água, destilação a vapor e destilação com vapor direto (PEREIRA, 2009).

Neste método, o material vegetal é imerso em água sob aquecimento até a fervura, resultando na formação de vapores que arrastam os compostos voláteis, os quais, após condensação, separam-se da fase aquosa por decantação. A composição dos óleos essenciais pode ser influenciada pelo contato com a água, tempo de extração e velocidade de aquecimento do equipamento (PRINS et al., 2006).

2.3. Extração supercrítica

A extração com fluido supercrítico é uma técnica que explora o poder de solvência de fluidos geralmente a temperaturas e pressões próximas ao seu ponto crítico. É particularmente efetiva no isolamento de substâncias de massa molar média e polaridade relativamente baixa (FOLLEGATTI ROMERO, 2007).

Neste processo são empregados solventes acima de seus pontos críticos para extrair componentes solúveis de uma mistura. Pode ser definida como a solubilização de determinados compostos de uma matriz sólida ou líquida em um solvente em condições supercríticas. Uma vantagem da extração com fluido supercrítico é a possibilidade de fácil recuperação do solvente supercrítico após o processo de extração, apenas pelo ajuste da pressão e/ou temperatura, podendo o mesmo ser continuamente reciclado. Isto elimina uma das etapas mais dispendiosas dos processos de extração convencionais que é a separação do produto extraído do solvente orgânico (PEREIRA, 2009).

2.4. Extração com solvente orgânico

A extração por solvente orgânico é uma operação unitária simples e foi aplicada pela primeira vez em 1835 por Robiquet para extração de compostos de flores (HUI & JOHN, 2007; PEREIRA, 2009). Os componentes contidos em uma matriz sólida são extraídos dissolvendo-os em um solvente líquido. Este processo é conhecido como lixiviação ou ainda extração sólido-líquido. A solução obtida, chamada micela (óleo + solvente), é removida do extrator e encaminhada para um evaporador para a remoção do solvente. Depois que o solvente é removido completamente, obtém-se um extrato concentrado. O solvente influencia na composição do extrato (parâmetros diferentes de solubilidade), na sua qualidade sensorial e no rendimento da extração (PEREIRA, 2009).

O solvente orgânico mais utilizado é o hexano, por ser o mais seletivo, possuir estreita faixa de ebulição (entre 69 e 70°C) e ser imiscível em água, o que evita misturas azeotrópicas. Nestas, o ponto de ebulição é constante, e a mistura se comporta como uma substância pura, dificultando a separação dos componentes pela destilação comum.

Há desvantagens em seu uso, podendo-se destacar seu custo, toxidez e o fato de ser extremamente inflamável (FOLLEGATTI ROMERO, 2007; PEREIRA, 2009).

3. As lipoproteínas

As lipoproteínas são compostas por lipídeos e proteínas, denominadas, por sua vez, apoproteínas (OJOPI et al., 2004). As lipoproteínas são caracterizadas por suas propriedades físico-químicas (LOPES et al., 1996), sendo, porém, a densidade a propriedade física na qual se baseia a atual classificação (GARCIA & OLIVEIRA, 1992; VALENTE, 1998). Pelo método da ultracentrifugação preparativa, classes distintas de lipoproteínas podem ser isoladas do plasma pós-prandial, e se diferenciam pelo tamanho, pela densidade e pela composição tanto lipídica como apoprotéica: quilomícrons (QM), lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de densidade baixa (LDL) e lipoproteínas de densidade alta (HDL), subdivididas em HDL₂ e HDL₃. A densidade das lipoproteínas aumenta proporcionalmente ao aumento do teor protéico e à redução do conteúdo lipídico (FORTI & DIAMENT, 2006; VALENTE, 1998; THOMPSON, 1989).

As interações entre as apoproteínas e os lipídeos das lipoproteínas podem ocorrer por duas maneiras: (1) por meio de regiões apolares hidrofóbicas das apoproteínas com o colesterol esterificado, triglicerídeos e com as cadeias de hidrocarbonetos dos fosfolipídeos; (2) por meio de ligações iônicas entre aminoácidos da região α -hélice das apoproteínas e a cabeça polar dos fosfolipídeos (GARCIA & OLIVEIRA, 1992; VALENTE, 1998). As apoproteínas desempenham papel importante no metabolismo lipídico. Além da função estrutural, permitindo a solubilização das lipoproteínas, contribuem para a regulação do metabolismo das lipoproteínas, modulando a atividade de enzimas como a lecitina-colesterol aciltransferase e lipoproteína-lipase, ligando-se também aos receptores da superfície celular (THOMPSON, 1989).

As lipoproteínas são sintetizadas no fígado e no intestino, ou formadas no plasma, pela modificação de outras lipoproteínas (CHAPMAN, 1982; VALENTE, 1998). As apoproteínas são sintetizadas como pré-apoproteínas e, após processamento, modificam-se em apoproteínas. Algumas permanecem fixas nas lipoproteínas, enquanto outras podem ser trocadas entre as diferentes lipoproteínas (MARINETTI, 1990; VALENTE, 1998).

4. A Apoproteína-E

A apoproteína-E (Apo-E) é uma glicoproteína plasmática de 36-kD que representa um papel crucial no metabolismo de lipoproteínas no plasma. Esta proteína facilita a absorção celular de quilomícrons remanescentes ricos em triglicerídeos e VLDL por meio do receptor de LDL e proteínas relacionadas (CALLEJA et al., 1999; KASHYAP et al., 1995; MAEDA et al., 2007; OSUGA, 1998). A apo-E é componente estrutural da superfície de quilomícrons, quilomícrons remanescentes, VLDL, IDL e HDL, sendo o principal componente de VLDL e HDL (CALLEJA et al., 1999; OJOPI et al., 2004). Esta apoproteína é primariamente sintetizada no fígado, podendo ser produzida no cérebro, intestino e em outras células e tecidos periféricos, incluindo macrófagos (FAZIO et al., 1997; OSUGA, 1998).

Deficiências na apo-E causam várias doenças envolvidas com o aumento no nível de colesterol e triglicerídeos na circulação, dentre elas, a aterosclerose. Além disso, já foi demonstrado que a apo-E regula o transporte e a solubilidade da proteína amilóide (A β) (GALLOWAY et al., 2008). Esta proteína é o principal constituinte do material amilóide que se concentra nos espaços intersticiais de vários tecidos em patologias denominadas genericamente de amiloidoses. Pacientes com a doença de Alzheimer apresentam no tecido nervoso acúmulos de proteína amilóide denominados de placas senis (OJOPI et al., 2004).

Segundo Pendse et al. (2009) a absorção de triglicerídeos mediada pela apo-E no fígado e tecido adiposo contribui para a manutenção dos níveis normais de lipídeos plasmáticos. A absorção de triglicerídeos no fígado e tecido adiposo na ausência da apo-E, contribui para o acúmulo de VLDL e quilomícrons remanescentes no plasma (Figura 3).

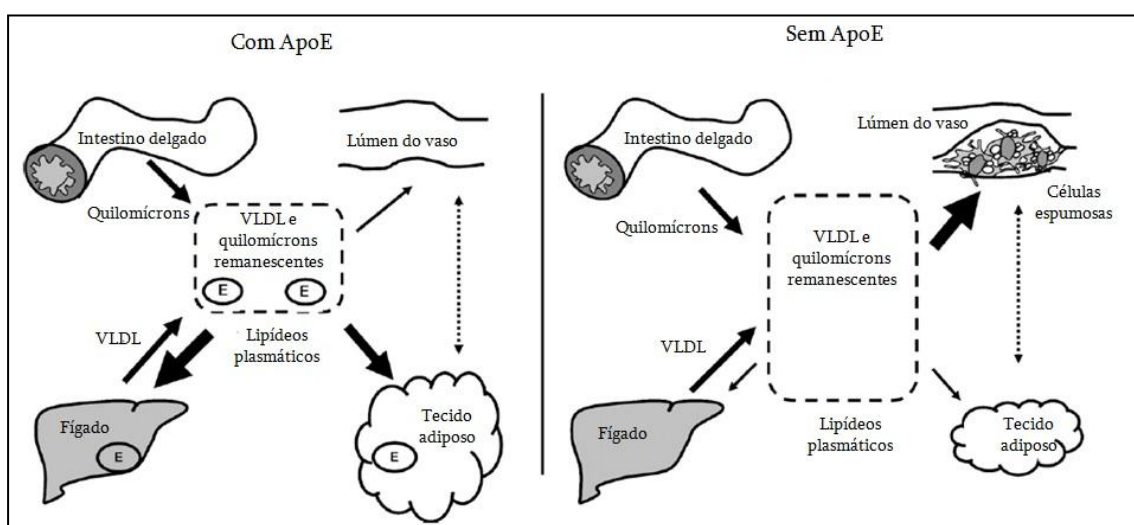


Figura 3: Atuação da Apo-E. Adaptado de Pendse et al. (2009). As setas representam mudanças no acúmulo dos lipídeos nos diferentes tecidos na presença ou ausência da Apo-E.

4. Os ácidos graxos poliinsaturados: metabolismo e importância

O nosso organismo consegue sintetizar a maioria dos ácidos graxos saturados e insaturados, exceto os chamados “essenciais”. Estes estão divididos em dois grupos principais: os da família ω -3 (ácido linolênico) e ω -6 (ácido linoléico) (ANJO, 2004). Estas famílias abrangem ácidos graxos que apresentam insaturações separadas apenas por um carbono metilênico, com a primeira insaturação (dupla ligação) no terceiro e sexto carbono, respectivamente, enumerado a partir do grupo metil terminal (extremidade identificada pela letra ômega- ω) (MARTIN et al., 2006; MOREIRA, 2006). Os ácidos graxos ω -3 são encontrados abundantemente em certas plantas e em óleo de peixe e os ω -6 são encontrados em óleos vegetais (ANJO, 2004).

Os ácidos graxos destas famílias são obtidos por meio da dieta ou produzidos pelo organismo a partir dos ácidos graxos α -linolênico e linoléico, pela ação de enzimas alongase e dessaturase. O processo ocorre no retículo endoplasmático, especialmente no fígado. As 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* (MARTIN et al., 2006; PERINI et al., 2010). Se a ação dessas enzimas for bloqueada no corpo, esses ácidos graxos terão de ser obtidos em outras fontes. Isso significa que os ácidos graxos α -linolênico e linoléico são ácidos graxos essenciais. O mesmo grupo de enzimas na via principal afeta o metabolismo tanto da série de ácidos graxos essenciais ω -3 quanto da série ω -6. Com isso concluiu-se que, os fatores que bloqueiam a produção de moléculas biologicamente ativas a partir do ácido linoléico, também sejam responsáveis pelo bloqueio da via metabólica a partir do ácido α -linolênico (EWIN, 1997). Os ácidos graxos destas duas famílias competem pelas mesmas enzimas envolvidas nas reações de dessaturação e alongação, sendo que essas enzimas têm maior afinidade pelos ácidos graxos da família ω -3 (PERINI et al., 2010).

Os principais ácidos graxos poliinsaturados da família ω -3 são: ácidos α -linolênico (α -LNA, 18:3 ω -3), ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 ω -3) e o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 ω -3) (Figura 4). O organismo humano não consegue sintetizar o ácido α -linolênico e o ácido linoléico (18:2 ω -6) devido à ausência das enzimas Δ -15 e Δ -12 dessaturases que são capazes de inserir duplas ligações no terceiro e sexto carbono, respectivamente, contados a partir do terminal metil. Por isso, é necessário obtê-los por meio da dieta para manter um *pool* adequado no organismo (MOREIRA, 2006). O ácido eicosapentaenóico é muito importante na prevenção de doenças cardiovasculares e hipertensão. O ácido docosahexaenóico apresenta capacidade de prevenir doença cardíaca, reduzir a taxa de triglicerídeos, além de ser importante no desenvolvimento da função visual e cerebral (ANJO, 2004).

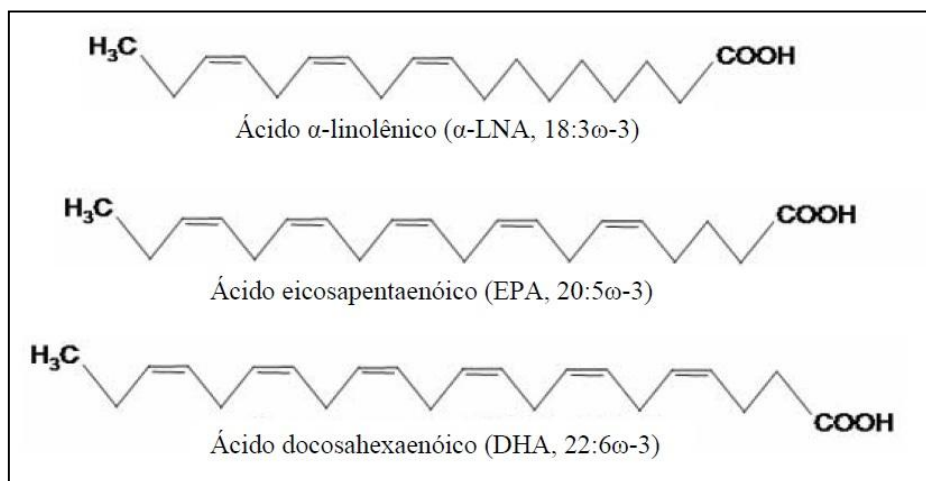


Figura 4: Estrutura química dos principais ácidos graxos da família ω -3 (MOREIRA, 2006).

Na série de ácidos graxos ω -6, existem outros compostos nos quais os ácidos graxos essenciais são importantes: ácido γ -linolênico (GLA, 18:3 ω -6), o primeiro produto metabólico formado a partir do ácido linoléico, e dois metabólitos do ácido γ -linolênico, a prostaglandina E1 (PGE1) e o ácido dihomo- γ -linolênico (DGLA, 20:3 ω -6), que pode ser convertido em prostaglandina E1 (Figura 5). O ácido linoléico é precursor ainda do ácido araquidônico (AA, 20:4 ω -6) (EWIN, 1997; MOREIRA, 2006). Outros derivados importantes são os eicosanóides. Os eicosanóides são mediadores

inflamatórios, metabólitos oxigenados dos ácidos graxos essenciais compostos por prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina, tromboxanos e derivados dos ácidos graxos, sendo o ácido araquidônico seu principal precursor (CAMPBELL & FARRELL, 2007; PERINI et al., 2010).

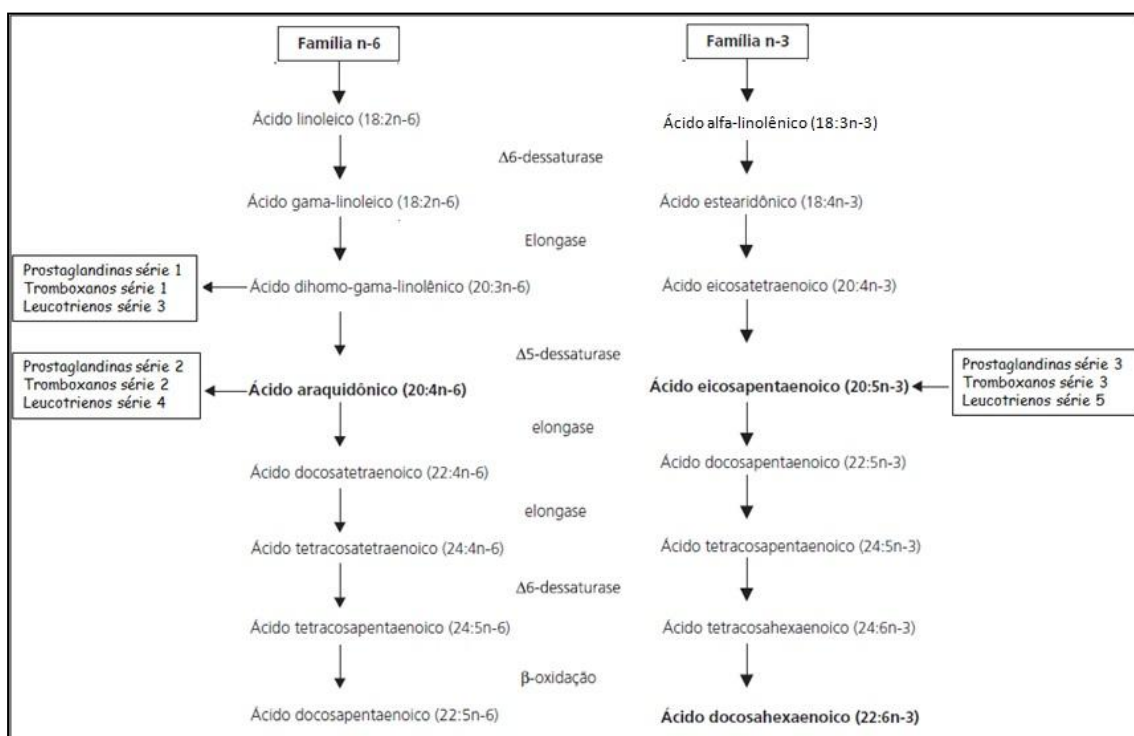


Figura 5: Metabolismo dos ácidos graxos das famílias ω-3 (n-3) e ω-6 (n-6) (Adaptado de PERINI et al., 2010).

As prostaglandinas possuem uma ampla gama de reações no organismo. Algumas atividades atribuídas à série de prostaglandina E1 e derivadas do ácido γ-linolênico são: inibição da proliferação de células anormais; diminuição da pressão arterial; inibição da síntese de colesterol; inibição da inflamação e ativação de determinados leucócitos (EWIN, 1997). As prostaglandinas da série 3, derivadas do ácido eicosapentaenoico, são substâncias que se assemelham aos hormônios e que regulam e protegem o organismo de efeitos como agregação plaquetária (devido a sua ação antitrombótica), inflamação e redução das respostas imunes (CAMPBELL & FARRELL, 2007; PERINI et al., 2010). Uma importante propriedade dos leucotrienos é sua capacidade de contrair o músculo liso. Essas substâncias regulam a maioria das atividades nos tecidos e são vitais para seu equilíbrio (CAMPBELL & FARRELL, 2007; PERINI et al., 2010).

Se a alimentação for deficiente no ácido graxo essencial a partir do qual essas substâncias são produzidas, a atividade do tecido será alterada (EWIN, 1997). Entretanto, um excesso de ω-6 na forma de ácido linoléico pode ser prejudicial à saúde. Um problema é que a concentração de ω-3 influencia a de ω-6 e, portanto, é necessário equilibrar a proporção destes na dieta (ANJO, 2004).

A razão entre as quantidades dos ácidos graxos ω-6 e ω-3 é importante na nutrição humana. Estudos clínicos demonstraram que razões de ω-6 e ω-3 em torno de

4:1 atuam reduzindo em até 70% o risco de doenças cardiovasculares. A relevância dessa razão é decorrente destes ácidos graxos competirem pelas enzimas envolvidas nas reações de dessaturação e alongamento da cadeia. Embora o equilíbrio favoreça a família ω -3, a conversão do ácido α -linolênico em ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa é fortemente influenciada pelos níveis de ácido linoléico na dieta (SOUZA & VISENTAINER, 2006).

Ao longo do tempo tem ocorrido um aumento da ingestão de gordura com maior consumo do ω -6 em relação ao ω -3. Entre os ácidos graxos da família ω -6, o ácido linoléico é o mais consumido na dieta ocidental, sendo 15g/dia, cerca de 10 vezes mais que o ácido α -linolênico, da família ω -3, cujo consumo na dieta ocidental é de 1,5g/dia (BURDGE & WOOTTON, 2002). A Organização Mundial da Saúde, em seu relatório sobre dieta, nutrição e prevenção de doenças crônicas, recomenda uma ingestão diária de 5 a 8% das calorias totais provenientes do ω -6, enquanto 1 a 2% oriundas do ω -3 (MOREIRA, 2006). Níveis de ingestão adequada de ácidos graxos essenciais foram estabelecidos pelo Instituto de Medicina de Washington, baseadas na ingestão média da população norte-americana. Esses valores preconizados de consumo são de 17g e 12g/dia de ácido linoléico (ω -6) e 1,6g e 1,1g/dia de ácido linolênico (ω -3) para homens e mulheres, respectivamente (INSTITUTE OF MEDICINE, 2002 Apud GARÓFOLO & PETRILLI, 2006).

A dieta é considerada o fator ambiental mais importante na determinação de doenças cardiovasculares. Dieta rica em colesterol e lipídeo saturado promove o desenvolvimento da aterosclerose. Por outro lado, dieta rica em lipídeo poliinsaturado reduz o desenvolvimento da doença em várias espécies. Estudos mostrando o efeito dos lipídeos monoinsaturados neste contexto são escassos (CALLEJA et al., 1999). Uma maior ingestão de ácidos graxos saturados aumenta os níveis de LDL e reduz HDL sendo essa, uma conhecida condição para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, pois o HDL é inversamente relacionado à aterosclerose, enquanto o LDL é um importante fator de risco para eventos cardiovasculares (GERMAN & DILLARD, 2004; GORDON et al., 1977). Por outro lado, uma dieta contendo monoinsaturados e poliinsaturados, como exposto, é atualmente recomendada, pois entre outros efeitos benéficos, pode reduzir o risco de aterosclerose. Além disso, estudo prévio mostra um papel benéfico dos ácidos graxos poliinsaturados na preservação da mucosa intestinal e na melhora da absorção lipídica (VIJAIMOHAN, 2006).

5. O modelo animal

Linhagens de camundongos têm sido utilizadas como modelos experimentais de pesquisa biomédica desde o início do século XX. O camundongo é o animal experimental de escolha em várias áreas por ser de fácil criação e manipulação, ter uma reprodução rápida e apresentar uma grande diversidade genética (SOARES et al., 2001).

O primeiro modelo de camundongos para o estudo da aterosclerose foi desenvolvido pela inativação do gene que codifica a apoproteína E (MAEDA et al., 2007; PIEDRAHITA et al., 1992; PLUMP et al., 1992; ZHANG et al., 1992). Este camundongo é saudável quando nasce, mas possui uma marcante alteração do perfil de lipídeos plasmáticos comparados ao camundongo normal, e rapidamente desenvolve lesões ateroscleróticas (TACONIC, 2008).

Esses camundongos possuem colesterol plasmático cerca de cinco vezes mais alto de que os normais, mesmo quando o indivíduo é tratado regularmente com ração com baixas taxas de lipídeos e colesterol. Nestes indivíduos, a evolução da lesão gordurosa na aorta proximal se desenvolve aos três meses de idade (BRITO, 2008; CALLEJA et al., 1999; MAEDA et al., 2007; NAKASHIMA et al., 1994; REDDICK et al., 1994; ZHANG et al., 1992). Os camundongos *knockout* possuem, portanto, mudança da distribuição normal de lipídeos plasmáticos (colesterol e triglicérides) para o predomínio da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e complexos de lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) em detrimento do predomínio dos complexos de lipoproteína de alta densidade (HDL). Vale ressaltar ainda, que a condição do modelo não interfere no desempenho reprodutivo em ambos sexos, e nenhuma diferença foi reportada com relação à massa corporal ou ao tamanho da ninhada, comparado com o camundongo normal (TACONIC, 2008).

6. O intestino delgado

O intestino delgado corresponde ao órgão do tubo digestivo situado entre o piloro e o ceco e é o sítio terminal da digestão dos alimentos, absorção de nutrientes e secreção endócrina. Os processos de digestão são completados no intestino delgado, onde os nutrientes são absorvidos pelas células epiteliais de revestimento. O intestino delgado é relativamente longo, possui a organização típica do tubo digestivo (Figura 6) e consiste em três segmentos: duodeno, jejuno e íleo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

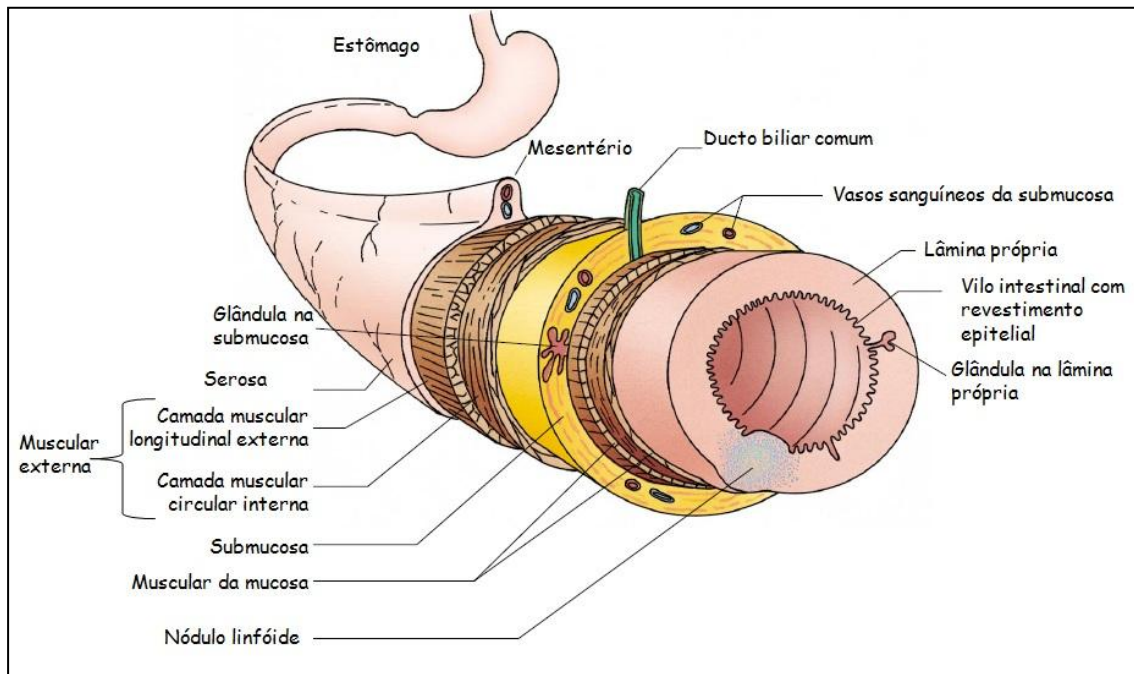


Figura 6: Desenho esquemático da organização da parede do tubo digestivo (Adaptado de GARTNER & HIATT, 2002).

A mucosa do intestino delgado apresenta várias estruturas que aumentam sua superfície, aumentando assim, a área disponível para absorção de nutrientes. São observadas três modificações (GARTNER & HIATT, 2003; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008):

- As **pregas circulares**, denominadas *plicae circularis*, em forma semilunar, circular ou espiral, consistem em dobras da mucosa e submucosa. Estas pregas são estruturas permanentes e são mais desenvolvidas no jejuno e, embora estejam frequentemente presentes no duodeno e íleo, não são características destes órgãos;
- As **vilosidades intestinais** ou **vilos** são projeções alongadas da mucosa (epitélio e lâmina própria) em direção ao lúmen. No duodeno possuem forma de folhas, gradualmente assumindo forma de dedos à medida que se aproximam do íleo. Entre os vilos existem pequenas aberturas de glândulas tubulares simples denominadas criptas (glândulas de Lieberkühn). O eixo central de cada vilosidade contém alças capilares, um canal linfático em fundo cego (quilífero ou lácteo) e algumas fibras musculares lisas, em um tecido conjuntivo frouxo rico em células linfóides;
- As **microvilosidades** são projeções da membrana plasmática das células epiteliais que cobrem as vilosidades intestinais.

A presença de pregas, vilosidades e microvilosidades aumentam muito a superfície de revestimento intestinal, uma característica importante num órgão onde a absorção ocorre tão intensamente. Calcula-se que as pregas aumentem a superfície intestinal em cerca de três vezes, as vilosidades aumentem em cerca de 10 vezes e as microvilosidades aumentem em cerca de 20 vezes a superfície. Em conjunto, estes processos são responsáveis por um aumento de aproximadamente 600 vezes na superfície intestinal (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

6.1. O epitélio do intestino delgado

O epitélio dos vilos é formado principalmente por células absorptivas (enterócitos) e células caliciformes e se continua com o epitélio das criptas, que por sua vez contém algumas células absorptivas, células caliciformes, células enteroendócrinas, células de Paneth e células-tronco (Figuras 7 e 8) (GARTNER & HIATT, 2003; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

As células absorptivas superficiais, ou enterócitos, são células colunares altas e com microvilosidades. Estas estruturas são protruções cilíndricas do citoplasma apical, cujas pontas estão cobertas por uma espessa camada de glicocálix que, não somente protege as microvilosidades da autodigestão, mas seus componentes enzimáticos também participam da parte final da digestão de dipeptídios e dissacarídios em seus monômeros. Estima-se que cada célula absorptiva possua em média 3.000 microvilosidades (GARTNER & HIATT, 2003; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Estas células reesterificam os ácidos graxos em triglicerídeos, formam os quilomícrons e transportam a massa dos nutrientes absorvidos para a lâmina própria, de onde são distribuídos para o restante do corpo (GARTNER & HIATT, 2003).

As células caliciformes são glândulas unicelulares. O duodeno tem o menor número de células caliciformes e seu número aumenta ao se aproximar do jejuno. Estas células produzem e secretam as mucinas, que formam o muco aderido no pólo apical dos enterócitos (GARTNER & HIATT, 2003). A principal função do muco é proteger o

epitélio de agressores químicos, físicos e biológicos, que podem estar presentes na luz intestinal. Dependendo da composição de seus monossacarídeos, as mucinas são classificadas em neutras e subtipos ácidos: não-sulfatadas (sialomucinas) e sulfatadas (sulfomucinas). As mucinas neutras contêm monossacarídeos de manose, galactose e galactosamina. As sialomucinas compõem um grupo que contém diversos monossacarídeos, compostos de nove carbonos, e na posição C1 há um grupo carboxilato, que está sempre ionizado a um pH fisiológico (SHIRAISHI et al, 2009).

As criptas de Lieberkühn são glândulas tubulosas simples (ou tubulosas ramificadas) que abrem espaços entre as vilosidades. Estas glândulas tubulosas são compostas por enterócitos, células caliciformes, células-tronco, células enteroendócrinas e células de Paneth (GARTNER & HIATT, 2003). Os enterócitos e as células caliciformes ocupam a metade superior da glândula. A metade basal da glândula não tem enterócitos e somente algumas células caliciformes; ao invés disso, a maioria das células são células-tronco, células enteroendócrinas e as células de Paneth (GARTNER & HIATT, 2003).

O percentual de renovação celular é determinado pela atividade das células-tronco/ progenitoras multipotentes, localizadas perto da base da cripta de Lieberkühn, próximas as células de Paneth (GARCIA & MIRANDA, 2010; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). A taxa de reprodução das células na cripta e a proporção de migração desses enterócitos são alteradas em vários estados fisiológicos ou patológicos. Essas mudanças na dinâmica celular determinam nos enterócitos do vilo, por exemplo, alteração na atividade transportadora relacionada ao tempo de vida (CARUSO & DEMONTE, 2005).

Esta proliferação para na junção cripta-vilosidade. As novas células podem mover-se para baixo e situar-se na base das criptas como células diferenciadas, as células de Paneth, ou podem migrar para cima ao longo dos vilos enquanto se diferenciam em enterócitos, células enteroendócrinas ou células caliciformes. Quando as células alcançam o ápice do vilo, eventualmente elas passam pelo processo de apoptose e são eliminadas para o lúmen intestinal (CARUSO & DEMONTE, 2005; GARCIA-MIRANDA, 2010).

As células de Paneth estão localizadas na porção basal das glândulas intestinais e produzem o agente antimicrobiano lisozima. Devido à sua atividade antibacteriana, a lisozima também exerce controle sobre a microbiota intestinal. Ao contrário das outras células, as células de Paneth têm o tempo de vida comparativamente longo, cerca de 20 dias nas microvilosidades (GARTNER & HIATT, 2003; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Os linfócitos intra-epiteliais estão localizados acima da lâmina própria, principalmente no duodeno e no jejuno proximal, e participam de modo decisivo na regulação das interações que ocorrem entre o meio ambiente e o sistema imunológico, tanto local quanto sistêmico. Estes linfócitos são predominantemente (98%) linfócitos $T\gamma\delta$ $CD8^+$ $CD45RO^+$ (células de memória) (MAYER, 2005).

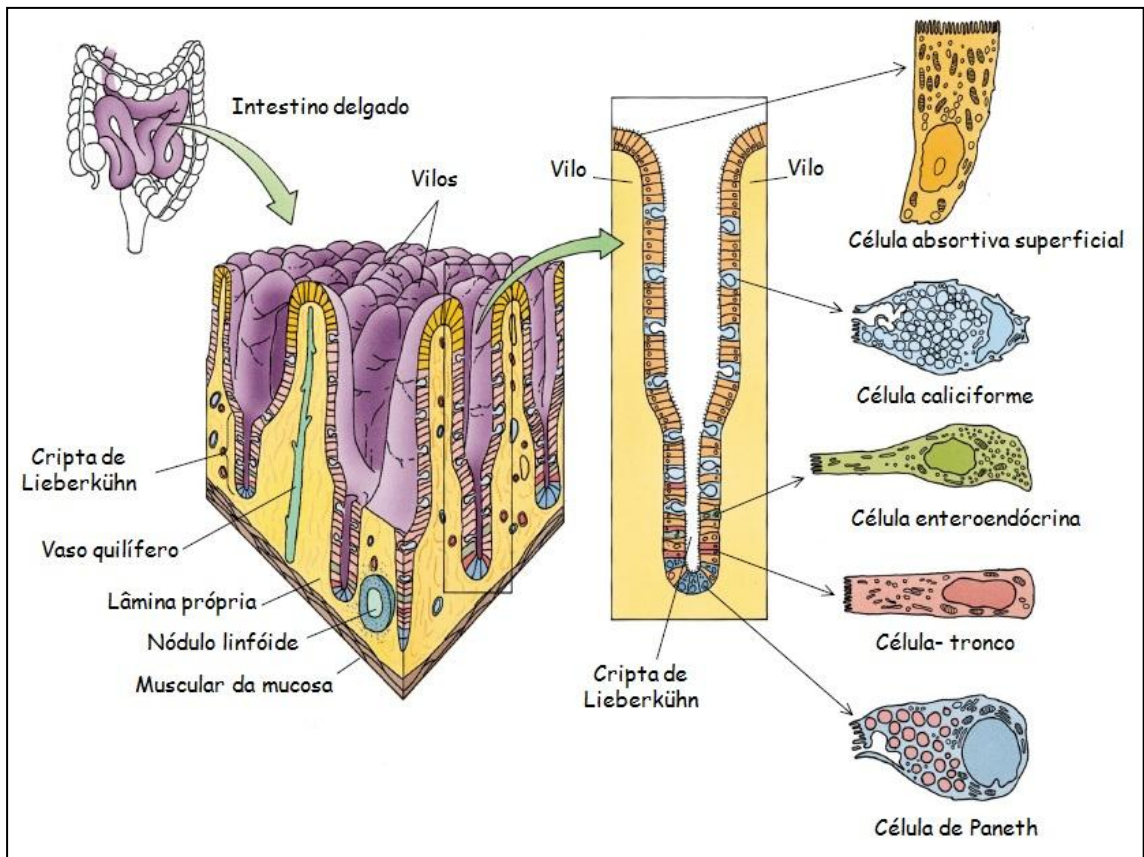


Figura 7: Diagrama esquemático da mucosa, vilos, criptas de Lieberkühn, e componentes celulares do intestino delgado de humanos (Adaptado de GARTNER & HIATT, 2002).

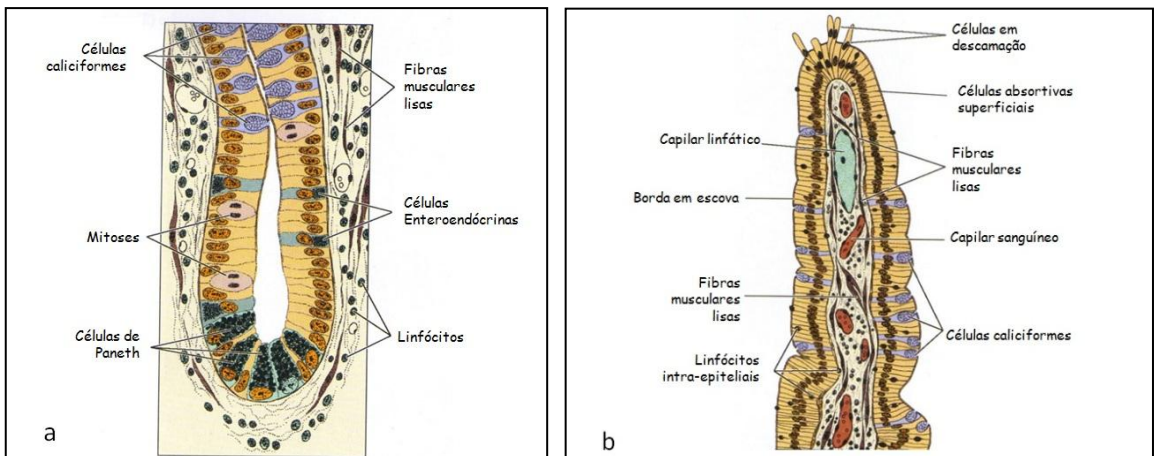


Figura 8: Diagrama esquemático da cripta de Lieberkühn (a), do ápice do vilão (b) e dos componentes celulares do intestino delgado de humanos (Adaptado de JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

6.2. Duodeno: caracterização e absorção de lipídeos

O duodeno é o segmento mais curto do intestino delgado. Ele recebe a bile do fígado e sucos digestivos do pâncreas, por meio do duto biliar comum e do duto pancreático, respectivamente. Estes dutos desembocam na luz do duodeno na papila duodenal (de Vater). O duodeno difere do jejuno e do íleo por suas vilosidades que são

mais largas, mais altas e mais numerosas por unidade de área. Ele possui menos células caliciformes por unidade de área do que os outros segmentos e possui as glândulas de Brünner em sua submucosa (GARTNER & HIATT, 2003).

O intestino tem um papel importante na homeostase do colesterol. É o órgão responsável pela regulação da quantidade de colesterol que será absorvido, seja ele oriundo da dieta ou produzido no organismo. Nesta região ocorre a montagem intracelular e liberação de quilomícrons, HDL nascentes e uma forma intestinal de lipoproteína de baixa densidade (NGUYEN et al., 2001).

Em mamíferos, os triglicerídeos são parcialmente hidrolisados no lúmen intestinal a ácidos graxos livres e monoacilgliceróis. Os produtos então se difundem em micelas para a mucosa intestinal onde são absorvidos como monômeros (OLSEN & RINGO, 1997). Os ácidos graxos são reesterificados em triglicerídeos no retículo endoplasmático antes de serem incorporados em lipoproteínas e serem exocitados ao espaço intersticial (THOMSON et al., 1993; TSO & FUJIMOTO, 1991).

Os ácidos graxos de cadeia longa e os monoglicerídeos entram no retículo endoplasmático liso dos enterócitos, onde são reesterificados formando triglicerídeos. Estes triglicerídeos são transferidos para o aparelho de Golgi, onde são combinados com uma capa de β -lipoproteína, produzida no retículo endoplasmático rugoso, formando quilomícrons. Estas grandes gotículas lipoprotéicas, empacotadas e liberadas pelo aparelho de Golgi, são transportadas para a membrana basolateral das células e liberadas na lâmina própria. Os quilomícrons seguem para os vasos quilíferos, preenchendo-os com uma substância rica em lipídeos, denominada quilo (GARTNER & HIATT, 2003).

Ácidos graxos de cadeia curta não entram no retículo endoplasmático liso para serem reesterificados. Estes ácidos graxos livres, que são suficientemente curtos para serem hidrossolúveis, dirigem-se para a membrana basolateral do enterócito, se difundem para a lâmina própria e penetram nas alças capilares e vão para o fígado onde são processados (Figura 9) (GARTNER & HIATT, 2003).

Os ácidos biliares são sintetizados a partir do colesterol no fígado e são secretados com a bile no intestino delgado. Uma pequena fração dos conjugados lipofílicos de ácidos biliares são absorvidos passivamente no pH ácido do duodeno. Ácidos biliares conjugados são absorvidos no jejuno por troca aniônica e por um mecanismo de transporte antiporte. No íleo, um transportador de ácido biliar Na^+ dependente participa do processo de absorção dos ácidos biliares conjugados (THOMSON et al., 2001).

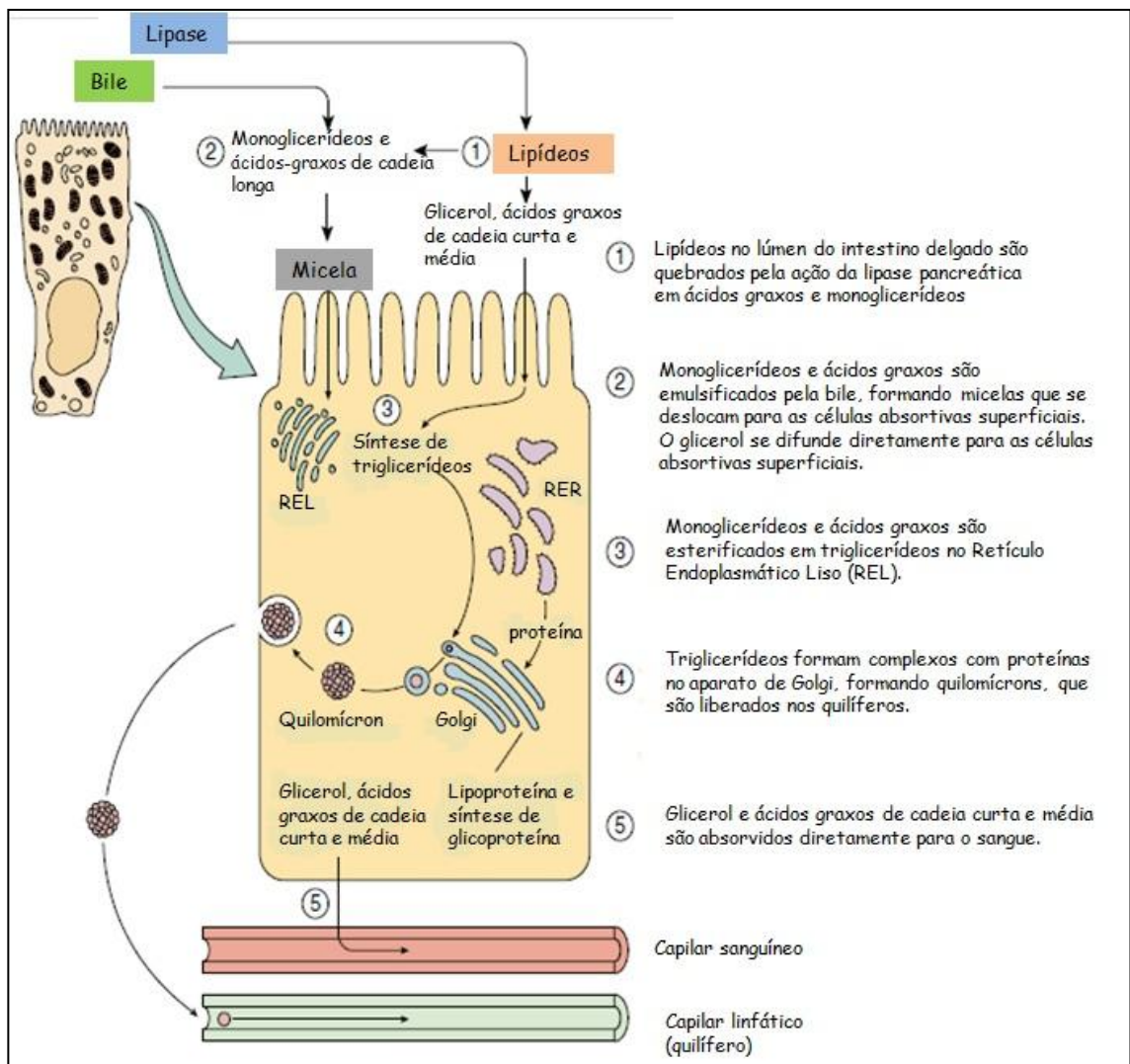


Figura 9: Absorção de lipídeos no intestino delgado (Adaptado de GARTNER & HIATT, 2002).

7. Fígado: estrutura e função

O fígado é o segundo maior órgão do corpo e considerado também a maior glândula. Nele os nutrientes absorvidos no intestino delgado são processados e armazenados para utilização por outros órgãos. Grande parte do sangue que vai para o fígado chega pela veia porta (70-80%); uma menor porcentagem é suprida pela artéria hepática. Todos os nutrientes absorvidos pelo intestino chegam ao fígado pela veia porta, exceto os quilomícrons, que chegam ao fígado pela artéria hepática. Sua posição no sistema circulatório é ideal para captar, transformar e acumular metabólitos e para a neutralização e eliminação de toxinas. A eliminação ocorre na bile, uma secreção exócrina do fígado, importante para a digestão de lipídeos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

O componente estrutural básico do fígado é a célula hepática ou hepatócito (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Estas estão dispostas em lóbulos hexagonais claramente demarcados por delgados elementos de tecido conjuntivo. Estas placas são separadas por espaços vasculares denominados sinusóides hepáticos. Nos locais em que três lóbulos clássicos entram em contato uns com os outros, os elementos de tecido

conjuntivo são mais abundantes e estas regiões são denominadas espaço porta (tríades). Os espaços porta contêm ramos pequenos da artéria hepática, da veia porta, dutos biliares interlobulares e vasos linfáticos (Figura 10) (GARTNER & HIATT, 2003).

Além disso, macrófagos residentes, denominados células de Kupffer, estão associados ao endotélio dos sinusóides. Este endotélio está separado dos hepatócitos pelo estreito espaço perissinusoidal ou espaço de Disse, e o plasma que passa pelos sinusóides tem livre acesso a este espaço (GARTNER & HIATT, 2003).

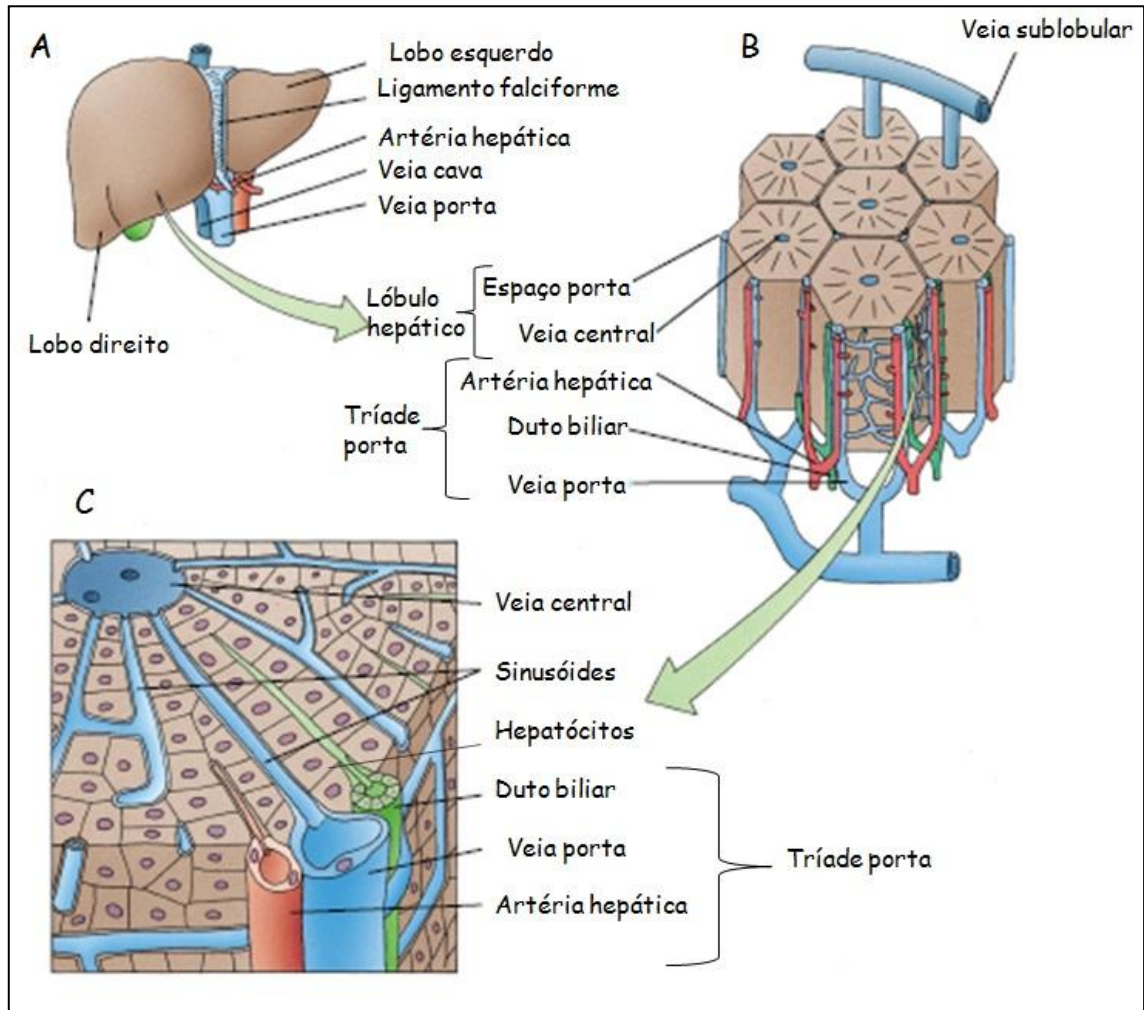


Figura 10: Desenho esquemático do fígado. A: Anatomia macroscópica do fígado; B: Lóbulos hepáticos mostrando os espaços porta e veia central; C: Parte do lóbululo esquerdo mostrando o espaço porta, placas de hepatócitos, sinusóides e canalículos biliares (Adaptado de GARTNER & HIATT, 2002).

7.1. Hepatócitos e o metabolismo dos lipídeos

Os hepatócitos constituem quase 75% do peso do fígado e produzem a bile primária que, modificada pelas células que revestem os dutos biliares e a vesícula biliar, torna-se a bile. Aproximadamente 75% dos hepatócitos possuem um único núcleo, enquanto os demais hepatócitos são binucleados. Os hepatócitos sintetizam ativamente proteínas para uso próprio, assim como, para exportação. Portanto, eles possuem abundância de ribossomos livres, retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi (GARTNER & HIATT, 2003).

Os hepatócitos contêm quantidades variáveis de inclusões sob a forma de gotículas de lipídeos. Estas gotículas são principalmente lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). Depósitos de glicogênio estão presentes como acúmulos elétrondensos denominados partículas β e localizados na vizinhança do retículo endoplasmático liso (GARTNER & HIATT, 2003).

Os quilomícrons, liberados pelos enterócitos no intestino delgado, seguem para o sistema linfático e chegam ao fígado por meio dos ramos da artéria hepática. Dentro dos hepatócitos, eles são degradados a ácidos graxos e glicerol. A seguir, os ácidos graxos são desnaturados e usados na síntese de fosfolipídeos e colesterol, ou são degradados para acetil coenzima A. Duas moléculas de acetil coenzima A se combinam formando ácido acetoacético. Grande parte deste ácido é convertida no ácido β - hidroxibutírico e parte em acetona. Estes três compostos são denominados corpos cetônicos. Fosfolipídeos, colesterol e corpos cetônicos são armazenados nos hepatócitos até sua liberação no espaço de Disse. Além disso, o fígado produz lipoproteínas de densidade muito baixa, que também são liberadas no espaço de Disse (GARTNER & HIATT, 2003).

Objetivos

1. Objetivos gerais

O objetivo geral deste trabalho foi extrair o óleo de sementes de sacha kiruma, determinar o perfil de ácidos graxos e avaliar os efeitos desse óleo na estrutura do duodeno e fígado de camundongos.

2. Objetivos específicos

- a) Obter o óleo das sementes de sacha kiruma utilizando o método de extração por solvente (hexano);
- b) Determinar o rendimento do processo de extração de óleo;
- c) Determinar a composição de ácidos graxos nas amostras do óleo extraído;
- d) Acompanhar o consumo alimentar e a evolução ponderal de camundongos selvagens e *knockout* Apo-E tratados com dieta controle e dieta com o óleo de sacha kiruma;
- e) Avaliar os efeitos do óleo de sacha kiruma na estrutura histológica do duodeno e fígado de camundongos selvagens e *knockout* Apo-E, machos e fêmeas.

Metodologia

1. Obtenção do óleo

1.1. Sementes

Foram utilizados três espécimes de sacha kiruma, estabelecidos em Viçosa, a partir da germinação de sementes provenientes da Estação Experimental Agrária "El Polvenir", Tarapoto (Peru). A cidade de Viçosa está localizada na Zona da Mata mineira (20° 45' 14" S, 42° 52' 53" O, 648,74 m), com clima caracterizado como tropical de altitude, com verões chuvosos, invernos frios e secos, temperatura média de 19°C e solo argissolo vermelho-amarelo (ABREU et al., 2008; MARAGON et al., 2003). Quando os frutos atingiram a maturidade, procedeu-se a coleta das sementes. Foram feitas três coletas ao longo de dois meses.

Após a colheita, as sementes foram secas em temperatura ambiente por 15 dias. Em seguida, foram acondicionadas em estufa com Circulação e Renovação de ar TE-394/2, Tecnal® a 45°C por 24 horas, a fim de desumidificá-las. Esta estufa foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Micorriza, do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. Após o processo foram obtidos 2,127kg de sementes desumidificadas.

1.2. Moagem das sementes

As sementes foram moídas em Moinho de Rotor Vertical com facas móveis e fixas, cedido pelo Laboratório de Painéis e Energia da Madeira, Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. Após a moagem foram obtidos 2,042kg de amostra.

1.3. Extração do óleo de sacha kiruma

Foi utilizado o método de extração por solvente com Soxhlet, utilizando hexano. Este método pode ser aplicado devido às características das sementes de sacha kiruma que apresentam alto teor de lipídeos. Toda a metodologia de extração foi realizada no Laboratório de Sementes, Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. O método foi adaptado para a amostra de acordo com descrição no Anexo I.

A primeira etapa do processo de extração foi a padronização da massa de sementes moídas a ser utilizada no cartucho de extração. De acordo com a aparelhagem disponível para o processo, foi possível utilizar cartuchos com 50g ou com 100g de amostra. O uso de cartuchos com 100g de amostra, apesar de representar a princípio uma vantagem pela redução do tempo total para a extração, mostrou-se pouco vantajoso devido ao menor rendimento em relação aos cartuchos de 50g. Optou-se pelos cartuchos com a menor massa a fim de se obter o maior rendimento possível e minimizar o desperdício de amostra.

Para remoção de partículas que tenham permanecido durante a extração, a amostra contendo solvente e óleo foi recolhida e filtrada a vácuo, utilizando uma bomba de 1,5 HP e papel de filtro com porosidade 11. Em seguida, a amostra passou por uma destilação.

A destilação utilizando rotavapor com vácuo tem como objetivo separar o hexano do óleo utilizando o seguinte equipamento: Evaporador rotativo a vácuo (condensador vertical) e o Banho ultratermostatizado com bomba de circulação (temperatura da água para o condensador do evaporador de $16^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$), cedidos pelo Laboratório de Sementes do Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa. O processo está descrito no Anexo II. Este processo demorou cerca de 2h30' por bateria de extração e garantiu aproximadamente 100% de eficiência na retirada do solvente do óleo bruto.

Em seguida, procedeu-se a etapa de borbulhar a amostra com nitrogênio. O objetivo desta etapa consiste em expulsar o restante de solvente ainda presente e também retirar o máximo do oxigênio da amostra. Com isso, minimiza-se a oxidação dos ácidos graxos do óleo. A metodologia está descrita no Anexo III. Ao fim desta etapa encontramos o óleo puro, que foi armazenado em frasco âmbar a -20°C . Foram realizadas seis baterias de extração, num total de 778ml de óleo bruto obtido.

2. Eficiência do processo de extração

Para obter os valores da eficiência de extração de cada sequência, foi utilizada a seguinte relação:

$$\text{Eficiência na extração (\%)} = \frac{\text{Volume de óleo bruto após o rotavapor} \times 100\%}{\text{Massa de sementes que entra no extrator}}$$

3. Obtenção dos ésteres de ácidos graxos do óleo de sacha kiruma

Para traçar o perfil lipídico do óleo de sacha kiruma no tocante ao teor de ácidos graxos livres, foi preciso realizar a saponificação e esterificação da amostra. Este método foi realizado no Laboratório de Bioquímica Nutricional, do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

A extração dos lipídeos seguiu o método proposto por Folch et al. (1957) utilizando 30mg de óleo e, em seguida, as amostras foram esterificadas pela técnica de Hartman & Lago (1973). As metodologias foram adaptadas para a amostra seguindo modificações apresentadas no Anexo IV.

3.1. Avaliação do perfil lipídico do óleo de sacha kiruma utilizando a cromatografia gasosa

A determinação do perfil de ácidos graxos do óleo de sacha kiruma foi feita por meio da cromatografia gasosa. O aparelho utilizado foi cedido pelo Laboratório de Nutrição Experimental, do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Foi utilizado um cromatógrafo a gás Shimadzu, com detector por ionização em chama (FID - *Flame Ionization Detector*) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (100m x 0,25mm id).

As condições de análise foram: programação da temperatura: 80°C com rampa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até alcançar 150°C e $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até alcançar a temperatura

de 250°C, temperatura do injetor mantida a 240°C e detector a 260°C; gás de arraste hidrogênio ultra puro, razão split: 5 e fluxo da coluna de 1,6mL/min.

A amostra obtida da extração descrita anteriormente estava acondicionada em frascos âmbar a -20°C. Foi retirada dessa condição e mantida em temperatura ambiente por 5min. A amostra foi recuperada com 200µL de n-hexano para cromatografia gasosa (Sigma®). Foi armazenada em *vial* para posterior injeção no aparelho. Foi realizada injeção de 0,2µL de amostra para a leitura. Os metil ésteres dos ácidos graxos mais abundantes foram identificados por comparação com o tempo de retenção dos padrões de ésteres metílicos dos ácidos graxos C-4 a C-22.

O padrão utilizado foi estabelecido a partir de uma mistura de padrões comerciais (Sigma®, EUA), de proporção de massa conhecida, contendo os ésteres metílicos dos seguintes ácidos graxos: butírico (4:0); capróico (6:0); caprílico (8:0); cáprico (10:0); undecanóico (11:0); láurico (12:0); tridecanóico (13:0); mirístico (14:0); miristoléico (14:1); pentadecanóico (15:0); cis-10-pentadecanóico (15:1); palmítico (16:0); palmitoléico (16:1); heptadecanóico (17:0); cis-10-heptadecanóico (17:1); esteárico (18:0); elaidico (18:1n9t); oléico (18:1n9c); linolelaídico (18:2n6t); linoléico (18:2n6c); araquídico (20:0); γ -linolênico (18:3n6); cis-11-eicosenóico (20:1); linolênico (18:3n3); heneicosanóico (21:0); cis-11,14- eicosadienóico (20:2); behênico (22:0); cis-8,11,14- eicosatrienóico (20:3n6); erúcico (22:1n9); cis-11,14,17- eicosatrienóico (20:3n3); araquidônico (20:4n6); tricosanóico (23:0); cis-13,16- docosadienóico (22:2); lignocérico (24:0); cis-5,8,11,14,17- eicosapentaenóico (20:5n3); nervônico (24:1); cis-4,7,10,13,16,19- docosahexaenóico (22:6n3). Os picos cromatográficos dos ésteres metílicos dos ácidos graxos do padrão foram utilizados como referência para determinar quais componentes estavam presentes na amostra (VIDAL, 2009).

A quantificação dos ácidos graxos presentes na amostra foi calculada mediante a porcentagem da área de cada pico correspondente ao ácido graxo identificado pelo padrão correspondente (VIDAL, 2009). A partir dos valores percentuais dos ácidos graxos foi calculada a relação poliinsaturados/ saturados. Para tal, os ácidos graxos poliinsaturados utilizados foram linoléico, linolênico e araquidônico e os ácidos graxos saturados foram palmítico e mirístico (FOLEGATTI ROMERO, 2007; HAMAKER et al, 1992; VIDAL, 2009).

4. Ensaio biológico

4.1. Origem e manutenção dos animais

Foram utilizados 40 camundongos (*Mus musculus*) Black, sendo 20 da linhagem C57BL/6 *knockout* para o gene *Apo-E* e 20 da linhagem C57BL/6 normal, dos dois sexos e provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram distribuídos em oito grupos (Tabela 2) de acordo com a linhagem, o sexo e o tratamento (dieta com ou sem o óleo extraído de sacha kiruma).

Tabela 2: Caracterização dos grupos experimentais.

Identificação	Número de indivíduos	Caracterização do grupo
ACM	5	Animais Apo-E -/-; dieta controle, machos
ACF	5	Animais Apo-E -/-; dieta controle, fêmeas
ATM	5	Animais Apo-E -/-; dieta tratada com o óleo de sacha kiruma, machos
ATF	5	Animais Apo-E -/-; dieta tratada com o óleo de sacha kiruma, fêmeas
BCM	5	Animais BlackC57/6; dieta controle, machos
BCF	5	Animais BlackC57/6; dieta controle, fêmeas
BTM	5	Animais BlackC57/6; dieta tratada com o óleo de sacha kiruma, machos
BTF	5	Animais BlackC57/6; dieta tratada com o óleo de sacha kiruma, fêmeas

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas de polietileno, com ventilação natural. Cada gaiola representava um grupo, com cinco indivíduos, em um total de oito grupos. As gaiolas foram mantidas no Biotério do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, localizado no Laboratório de Nutrição Experimental, sala de Experimentação II- Setor de Camundongos. A sala possui controle de fotoperíodo com ciclos de claro/escuro de 12 horas, e temperatura variando entre 18 e 22°C.

Os animais iniciaram o tratamento com 44 dias de idade, o que caracteriza indivíduos juvenis. O tratamento teve duração de 90 dias e os animais foram submetidos à eutanásia com 134 dias de idade.

As gaiolas foram cuidadosamente higienizadas duas vezes por semana, no momento em que se processava a troca da maravalha por outra previamente autoclavada. A água do bebedouro também era renovada, assim como a ração.

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (Processo nº 29/2010).

4.2. Dieta com o óleo de sacha kiruma

Antes de iniciar o tratamento, os animais foram tratados com dieta comercial para murinos e passaram 12 horas em jejum, para a retirada de sangue, antes da oferta da nova ração. Esta foi elaborada de acordo com determinações AIN-93G formulada para roedores em fase de crescimento, gestação e lactação (Tabela 3).

As dietas foram calculadas e adequadas para que a ingestão dos nutrientes não fosse desigual entre os grupos. Foram preparadas no Laboratório de Nutrição Experimental, Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, manualmente e devidamente acondicionadas a -20°C até o momento de ofertar aos animais.

Tabela 3: Formulação das dietas controle e experimental. Em acordo com determinações AIN-93G formulada para roedores em fase de crescimento, gestação e lactação.

Ingredientes	Dieta controle (%)	Dieta experimental (%)
Caseína	20	20
Amido dextrinizado	13,2	13,2
Sacarose	10	10
Óleo de soja	7	-
Óleo de sacha kiruma	-	7
Fibras	5	5
Mistura de minerais	3,5	3,5
Mistura de vitaminas	1	1
L-cistina	0,3	0,3
Bitartarato de colina	0,25	0,25
Amido de milho	39,75	39,75

O consumo alimentar foi verificado duas vezes por semana em cada grupo. O cálculo se baseou na ração restante no comedouro, em relação à quantidade de ração inicial. Inicialmente foi considerado um consumo de 10g/ animal por dia. Ao longo das semanas essa oferta foi ajustada de acordo com o consumo dos grupos, numa média de 4g/animal por dia.

4.3. Desenvolvimento dos animais

Ao longo do tratamento, os animais tiveram livre acesso a água e alimento. O peso corporal individual foi obtido quinzenalmente. Para a avaliação do crescimento dos animais, foi utilizado também o índice hepatossomático (IH):

$$IH = \frac{\text{Peso do fígado} \times 100\%}{\text{Peso corporal}}$$

4.4. Eutanásia

Ao final do experimento, todos os animais foram submetidos à eutanásia para a coleta dos órgãos, utilizando-se a inalação com gás carbônico. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Nutrição Experimental, do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa. A massa final de cada camundongo foi obtida minutos antes do procedimento.

5. Avaliação dos efeitos do tratamento no duodeno

5.1. Obtenção dos fragmentos do duodeno

O intestino delgado foi identificado em sua porção inicial e cuidadosamente distendido para que os conteúdos permanecessem em posição (MARQUES, 2006). Para a localização do duodeno, foi utilizado como referência o esfíncter pilórico e a interseção duodeno/jejuno. Incluindo o esfíncter pilórico, extraiu-se um fragmento com aproximadamente dois centímetros de comprimento. As amostras foram colhidas e

lavadas rapidamente em solução salina. Os fragmentos foram fixados em solução de paraformaldeído-glutaraldeído (KARNOVSKY, 1965). O material permaneceu por 24 horas no fixador e foi posteriormente transferido para solução de álcool 70% até a inclusão em glicol-metacrilato (Historesin®, LEICA).

5.2. Microtomia, Coloração e Histoquímica

Os procedimentos de microtomia, coloração e histoquímica foram realizados no Laboratório de Biologia Estrutural e Histofisiologia Reprodutiva e Digestiva, do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa. Os fragmentos do duodeno foram seccionados em micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045 Multicut, Germany) para a obtenção de cortes transversais semi-seriados. O material foi seccionado na espessura de 2µm e intervalo entre cortes de 40µm.

Os cortes foram submetidos aos seguintes métodos: coloração com Azul de Toluidina-Borato de Sódio 1% e técnica combinada do Azul de Alcian (AB) pH 2,5 com o Ácido Periódico de Schiff (PAS) (AB+PAS).

5.2.1. Azul de Toluidina-Borato de Sódio 1%

As preparações foram imersas na solução de Azul de Toluidina-Borato de Sódio 1% por 30 segundos em uma cuba de coloração. Os cortes foram posteriormente lavados em água corrente, as preparações foram secas em temperatura-ambiente e montadas em Entellan® (Merck). Com essa coloração evidenciou-se regiões metacromáticas, núcleos celulares e a estrutura histológica geral da parede do duodeno. Nestas preparações foi feita a morfometria da mucosa e da túnica muscular.

5.2.2 Técnica combinada AB+PAS modificada de Bancroft & Stevens (1996)

As preparações foram tratadas inicialmente com solução tampão por 15 minutos em temperatura ambiente. Na sequência, com solução de Azul de Alcian pH 2,5 por cerca de duas horas em estufa a 60°C. Após esse tempo, o material recebeu banhos sucessivos em água corrente e depois em água destilada. A próxima etapa envolveu tratamento do material com solução aquosa de ácido periódico 1% por 45 minutos. Os cortes foram expostos ao Reativo de Schiff durante cerca de 60 minutos, com a cuba envolvida por uma folha de papel alumínio, a fim de proteger o material da luz. O material foi então novamente banhado em água corrente durante cinco a dez minutos. Os núcleos foram contracorados com hematoxilina de Mayer durante dois minutos. O material foi novamente lavado em água corrente. As lâminas foram secas em temperatura ambiente e montadas em Entellan® (Merck).

Com esta técnica foi possível evidenciar em azul o mucopolissacarídeo ácido e, na cor magenta, o mucopolissacarídeo neutro. Quando houve mistura de ambos, a cor dependeu do mucopolissacarídeo dominante, podendo variar do azul púrpura ao violeta. Nestas preparações foram feitas as quantificações das células caliciformes e das células de Paneth.

5.3. Captura de imagens

As imagens das secções histológicas foram capturadas a partir do microscópio de luz (*Olympus AX 70*) por meio de uma câmera de captura acoplada a um sistema

computadorizado (o programa *SPOT*, versão 3.5.9 para *Windows*) no Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

Foram capturadas 40 imagens das preparações coradas com Azul de Toluidina-Borato de Sódio 1% e 10 imagens das preparações submetidas à técnica combinada AB+PAS. Foram capturadas imagens de, pelo menos, cinco cortes transversais do duodeno do mesmo animal utilizando-se objetiva de 10X e zoom de 1,25 para as preparações coradas com Azul de Toluidina e objetiva de 20X e zoom de 1,25 para as preparações submetidas à técnica combinada AB+PAS.

5.4. Análise histomorfométrica

Estas análises foram feitas no Programa *Image Pro Plus* versão 4.5 para *Windows*.

5.4.1 Morfometria dos vilos

A morfometria dos vilos envolveu a determinação do diâmetro basal, mediano e apical, e altura de 50 vilos por animal. A altura do vilos foi determinada pelo traço desde o ápice até a linha do diâmetro basal (PIRES et al, 2003). Foram feitas cinco medidas de cada parâmetro em 10 campos diferentes. Com estes dados encontramos também a relação altura do vilos/largura do vilos para cada animal.

A morfometria do vilos envolveu, ainda, avaliar a altura do epitélio absorptivo. Em 30 vilos aleatórios foram obtidos cinco valores para esta altura.

5.4.2. Quantificação de enterócitos e linfócitos intraepiteliais no vilos

Em seis vilos bem delineados em corte longitudinal e em campos aleatórios, foram quantificados os enterócitos e linfócitos intraepiteliais. Com esses dados, foi obtida a relação enterócito/linfócito intraepitelial para cada animal.

5.4.3. Morfometria da cripta de Lieberkühn

Esta morfometria envolveu determinar os diâmetros da base, meio e ápice, e o comprimento de 50 criptas por animal. Com esta análise, foi possível obter, ainda, relação altura do vilos/altura da cripta de cada animal.

5.4.4. Morfometria da mucosa

Foram determinadas as espessuras da mucosa basal (epitélio da base do vilos até o início da muscular) e da mucosa total (ápice do vilos até o início da muscular). Foram feitas 10 medidas por animal para cada parâmetro, em fotos aleatórias.

5.4.5. Morfometria das túnicas musculares

Foram determinadas as espessuras da subcamada muscular longitudinal externa, a subcamada muscular circular interna e a espessura total da túnica muscular. Foram obtidas 50 medidas de cada parâmetro por animal, cinco medidas por campo, em dez campos diferentes.

5.4.6. Quantificação das células caliciformes por mm² de mucosa

Em dez campos por animal, foi determinada a área da mucosa a ser analisada. Nesta área, foram quantificadas as células caliciformes, de acordo com a coloração do muco evidenciado pela técnica. Os valores foram convertidos para uma área de 1mm² de mucosa a fim de padronização.

5.4.7. Quantificação da célula de Paneth por mm² de mucosa

Nos mesmos campos utilizados para a análise anterior também foram quantificados as células de Paneth. Sua evidenciação foi possível, pois os grânulos em seu citoplasma são evidenciados na técnica, além de sua localização basal. Os valores foram convertidos para uma área de 1mm² de mucosa a fim de padronização.

5.4.8. Obtenção da superfície de absorção (SA) do duodeno:

Para obtenção destes valores, foi utilizada a seguinte fórmula (HARDIN et al., 1999):

$$SA (\mu\text{m}^2) = \text{Altura do vilo } (\mu\text{m}) \times \text{Largura a 50\% de altura do vilo } (\mu\text{m})$$

6. Avaliações dos efeitos do tratamento no fígado

6.1. Obtenção dos fragmentos de fígado

O fígado foi extraído, lavado imediatamente com solução salina e pesado. Na sequência, parte da amostra foi fixada em solução de paraformaldeído-glutaraldeído (KARNOVSKY, 1965). O material permaneceu por 24 horas no fixador e foi posteriormente transferido para solução de álcool 70% até a inclusão em glicol-metacrilato (Historesin®, LEICA).

6.2. Microtomia e Coloração

Os procedimentos de microtomia e coloração foram realizados no Laboratório de Biologia Estrutural e Histofisiologia Reprodutiva e Digestiva, Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa. O fragmento de fígado foi seccionado em micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045 Multicut, Germany) para a obtenção de cortes transversais semi-seriados. O material foi seccionado na espessura de 2 μm e intervalo entre cortes de 20 μm e corado com Hematoxilina-Eosina para melhor interpretação da morfologia do parênquima e estroma hepático.

No método de coloração, as preparações foram mergulhadas na solução de Hematoxilina por três minutos. Na sequência foram lavadas com água corrente e mergulhadas em solução de Eosina por 30 segundos. Novamente, banho em água corrente. As preparações foram secas em temperatura ambiente, sendo a montagem realizada com o meio Entellan® (Merck).

6.3. Captura de imagens

As imagens das secções histológicas foram capturadas a partir do microscópio de luz (*Olympus AX 70*) por meio de uma câmera de captura acoplada a um sistema

computadorizado (o programa *SPOT*, versão 3.5.9 para *Windows*) no Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Foram capturadas 10 imagens para cada animal com objetiva de 20X e zoom de 2,00.

6.4. Análise histomorfométrica

Esta análise foi feita no Programa *Image Pro Plus* versão 4.5 para *Windows*. Em dez campos diferentes para cada animal, foi aplicada uma grade com 266 intersecções, totalizando 2.660 pontos por animal. Foram contabilizadas as intersecções em hepatócito binucleado, hepatócito mononucleado, citoplasma, sinusóide, macrófago, gotícula lipídica, necrose e vaso sanguíneo. Nestes mesmos campos foram obtidos valores para o diâmetro celular e nuclear de 30 hepatócitos.

Hepatócitos binucleados e mononucleados foram considerados quando a intersecção se encontrava sobre estes núcleos. Intersecções em outras regiões do citoplasma, salvo núcleo ou gotícula lipídica, foram consideradas na classificação “citoplasma”. As gotículas lipídicas foram reconhecidas pela imagem negativa, o espaço branco. A necrose foi reconhecida pela morfologia disforme do núcleo e citoplasma, coloração diferenciada e presença de núcleos picnóticos.

7. Análise Estatística

Para a comparação entre as médias obtidas na observação do duodeno e fígado foi aplicado, inicialmente, o teste de Kolmogorov-Smirnov, que verifica a normalidade das variáveis. Para verificar a diferença entre dois grupos independentes com distribuição normal, foi utilizado o teste paramétrico de T- Student Newman-Keuls e para os grupos que não seguiram a distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico U de Mann-Whitney.

Todos estes testes foram realizados com o *software* SigmaStat 3.5 com nível de significância igual a 5% ($p < 0,05$).

8. Interpretação dos resultados

Os grupos foram comparados dois a dois considerando o tratamento (T) com o controle (C), as linhagens *knockout* (A) com a selvagem (B), e machos (M) com fêmeas (F) (Tabelas 2 e 4).

Tabela 4: Combinação de grupos utilizada para a interpretação dos resultados.

Considerando o tratamento proposto	Considerando a linhagem	Considerando o sexo
ATM X ACM	ATM X BTM	ATM X ATF
ATF X ACF	ATF X BTF	BTM X BTF
BTM X BCM	ACM X BCM	ACM X ACF
BTF X BCF	ACF X BCF	BCM X BCF

Resultados

Extração e avaliação do óleo das sementes de sachá kiruma

1. Rendimento da extração de óleo

A tabela 5 apresenta os resultados de eficiência da extração do óleo. A média de extração foi de 38,08%.

Tabela 5: Rendimento das seis baterias de extração do óleo de sachá kiruma.

Baterias	Cartucho	Total de amostra (g)	Óleo bruto extraído (ml)	Eficiência na extração (%)	Resíduo no cartucho (g)
1	6 de 50g	300	134	44,66	191
2	6 de 100g	600	220	36,67	424,10
3	3 de 100g	300	101	33,66	215,5°
4	6 de 50g	300	121	40,33	198,30
5	6 de 50	300	106	35,33	205,64
6	4 de 50g + 1 de 39,38g	239,38	96	40,10	159,21
	TOTAL	2.039,38 ^a	778	38,08	1.396,45

^aO total de amostra inserida no extrator foi menor que a obtida após a moagem das sementes devido as perdas durante a pesagem e preparo dos cartuchos.

2. Perfil de ácidos graxos do óleo de sachá kiruma

Os resultados preliminares da cromatografia gasosa indicaram ésteres de ácidos graxos de cadeia longa (Tabela 6). Os resultados mostraram presença de intermediários da cadeia de biossíntese dos ácidos graxos linoléico e linolênico, indicando a presença inicial destes ácidos graxos. O ácido graxo com maior porcentagem na amostra (50,61%) foi o eicosadienóico (C20:2n6), produto direto da elongação do ácido graxo linoléico (C18:2n6), da família ω -6, muito encontrado em óleos vegetais.

Foi encontrada neste óleo alta concentração de poliinsaturados, 95,48% e baixa concentração de ácidos graxos saturados (4,42%). Outros ácidos graxos encontrados foram da família ω -9, o ácido oléico (C18:1n9) (6,37%), o ácido elaídico (C18:1n9t) (2,42%) e o ácido erúico (C22:1n9) (0,02%).

Tabela 6: Ácidos graxos (% de área) do óleo extraído das sementes de sachá kiruma.

Ésteres de Ácidos graxos	% de área
Saturados	
Mirístico (C14:0)	0,0252
Palmítico (C16:0)	4,2853
Heptadecanóico (C17:0)	0,0700
Behênico (C22:0)	0,0273
Lignocérico (C24:0)	0,0094
Insaturados	
Monoinsaturados	
cis-10-heptadecenóico (C17:1)	0,0273
Nervônico (C24:1)	0,0066
Poliinsaturados	
Ômega 3	
Linolênico (C18:3n3)	0,0092
Eicosatrienóico (C20:3n3)	0,0109
Ômega 6	
Linoléico (C18:2n6)	34,9018
γ -linolênico (C18:3n6)	0,0643
Eicosadienóico (C20:2n6)	50,6126
Araquidônico (C20:4n6)	0,0090
Docosadienóico (C22:2n6)	0,0169
Linolelaídico (C18:2n6t)	1,0473
Ômega 7	
Palmitoléico (C16:1n7)	0,0672
Ômega 9	
Elaídico(C18:1n9t)	2,4156
Oléico (C18:1n9)	6,3744
Erúico (C22:1n9)	0,0196
ΣSaturados	4,4172
ΣInsaturados	95,5827
ΣMonoinsaturados	0,1011
ΣPoliinsaturados	95,4816

3. Relação de ácidos graxos poliinsaturados/saturados no óleo

Nessa relação foram considerados os ácidos graxos poliinsaturados, linoléico, linolênico e araquidônico e os ácidos graxos saturados, palmítico e mirístico, obtendo-se o valor de 8,10 (Tabela 7).

Tabela 7: Principais ácidos graxos encontrados no óleo de sacha kiruma e a relação poliinsaturados/saturados.

Ácidos graxos	Concentração (%)
Linoléico (C18:2n6)	34,9018
Linolênico (C18:3n3)	0,0092
Araquidônico (C20:4n6)	0,0090
Poliinsaturados	34,92
Mirístico (C14:0)	0,0252
Palmítico (C16:0)	4,2853
Saturados	4,3105
Relação poliinsaturados/ saturados	8,10

Ensaio Biológico

1. Consumo alimentar

Nas duas primeiras semanas do experimento, que corresponderam ao período de adaptação dos animais quanto à dieta e acomodação, não se observou redução no consumo alimentar. Durante o experimento o consumo se manteve com pouca oscilação, com média de 3,5g/animal/dia (Figura 11).

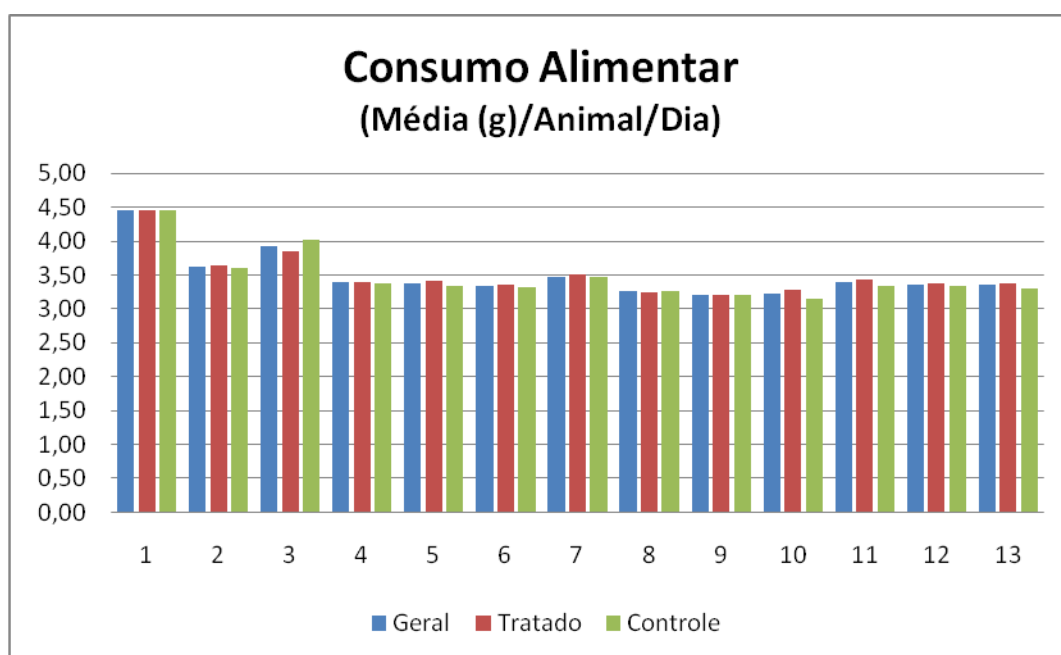


Figura 11: Consumo alimentar dos grupos tratados, controles e consumo geral ao longo do tratamento.

2. Evolução ponderal

A massa corporal inicial dos animais variou entre 16 e 25g e, ao longo das quinzenas (Q) oscilou entre 18 e 25g (Figura 12).

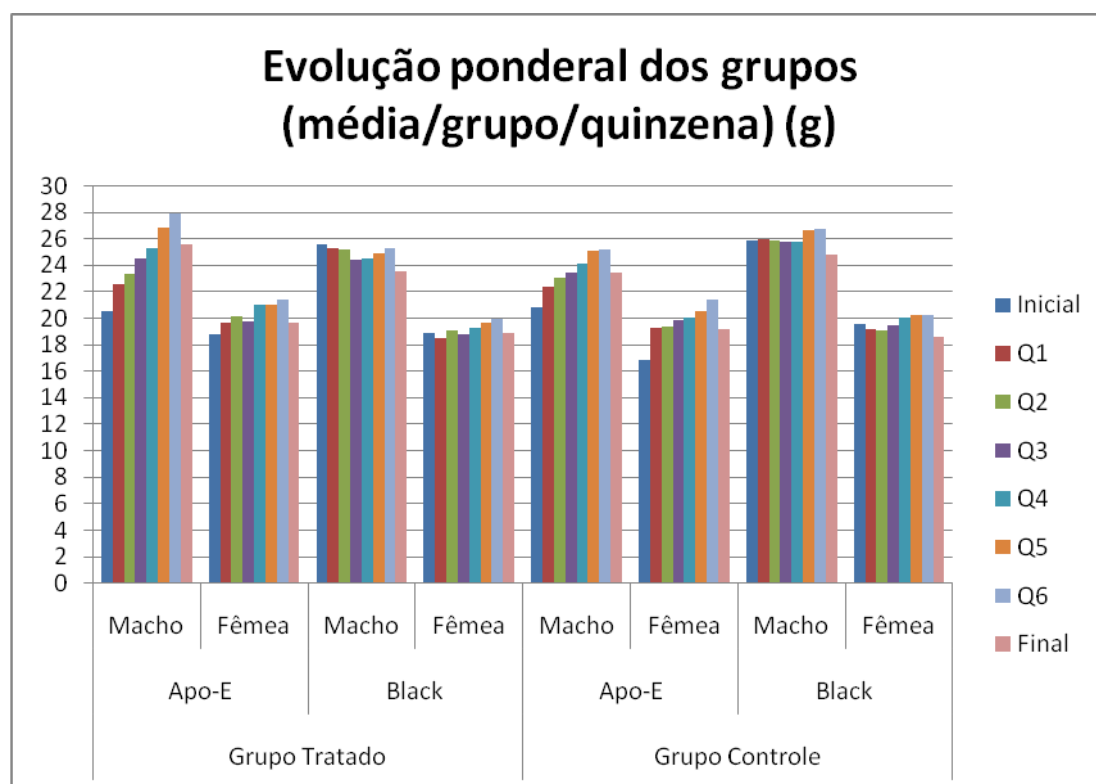


Figura 12: Evolução ponderal dos camundongos ao longo das quinzenas (Q).

3. Variação da massa corporal, consumo alimentar e índice hepatossomático

Foram encontradas diferenças relacionadas a linhagem e ao sexo dos camundongos para as médias de massa corporal inicial, em que foram encontrados machos e indivíduos da linhagem BlackC57/6 com maiores valores em relação as fêmeas, ou a linhagem *knockout*. A média do grupo BTM foi maior em relação a BTF; ACM maior em relação a ACF; BCM maior em relação a BCF; BCM maior em relação a ACM e BTM maior em relação a ATM. Considerando as médias de massa corporal final, foram encontradas diferenças relacionadas ao sexo dos camundongos. A média dos grupos com camundongos machos foram maiores em relação aos grupos com camundongos fêmeas, similar ao que foi obtido para a massa corporal inicial. Assim, ATM maior em relação a ATF; ACM maior em relação a ACF; BTM maior em relação a BTF e BCM em relação a BCF. Observando a variação de massa nestes grupos, foram encontradas diferenças relacionadas a linhagem e ao sexo dos camundongos. A média encontrada para o grupo ATM foi maior em relação a ATF, como também com relação a BTM (Tabela 8).

Outra informação que foi utilizada para evidenciar o crescimento e desenvolvimento dos camundongos foi o índice hepatossomático. Apenas a média do

grupo ATF apresentou diferença estatística em relação aos demais. A média de ATF foi maior em relação a ACF, em relação a ATM e em relação a BTF (Tabela 8).

Tabela 8: Dados de massa corporal, consumo alimentar e índice hepatossomático.

Grupo	Massa corporal inicial (g)	Massa corporal final (g)	Varição da massa corporal (g)	Consumo alimentar (g/dia/animal)	Índice hepatossomático
ATM	20,52±2,14 ^a	25,56±2,65 ^b	5,042±2,289 ^c	3,896	0,047±0,001 ^a
ACM	20,79±2,33 ^a	23,42±1,60 ^b	2,630±2,778 ^{ac}	3,560	0,043±0,005 ^a
ATF	18,75±1,35 ^{ab}	19,71±0,81 ^a	0,957±1,590 ^{ab}	3,641	0,053±0,003 ^b
ACF	16,81±1,84 ^b	19,15±0,86 ^a	2,334±1,225 ^{ac}	3,538	0,047±0,013 ^a
BTM	25,59±1,09 ^c	23,55±0,64 ^b	-2,036±0,596 ^b	3,278	0,041±0,002 ^a
BCM	25,89±3,08 ^c	24,85±2,22 ^b	-1,032±3,928 ^{ab}	3,590	0,042±0,003 ^a
BTF	18,93±0,80 ^{ab}	18,91±0,45 ^a	-0,020±1,147 ^{ab}	3,182	0,043±0,002 ^a
BCF	19,56±1,15 ^{ab}	18,59±1,16 ^a	-0,975±1,422 ^{ab}	3,177	0,047±0,002 ^a

Médias± desvio padrão. Médias na coluna seguidas por mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo Teste de Newman-Keuls.

Avaliação histomorfométrica do duodeno

1. Morfologia do duodeno

Com este tratamento não foram encontrados indícios de que o óleo extraído das sementes de sacha kiruma possa alterar a integridade da mucosa do duodeno seja em animais *knockout* para o gene *Apo-E*, seja em animais selvagens BlackC57/6. Observando as preparações histológicas do duodeno, foi encontrada uma mucosa íntegra com vilosidades preservadas e submucosa com características consideradas normais para os mamíferos (Figuras 13 e 15). As subcamadas musculares apresentavam-se, da mesma forma, com morfologia normal.

2. Morfometria dos vilos

A morfometria dos vilos no duodeno não mostrou diferenças entre os grupos nas médias obtidas para altura, largura do vilo e diâmetro apical do vilo. Considerando o diâmetro basal do vilo, foi encontrada diferença na média de BCM, maior em relação a BCF. O tratamento proposto também não alterou a relação entre altura do vilo/largura do vilo (Tabela 9; Figuras 13 e 15).

Tabela 9: Dados da morfometria dos vilos do duodeno.

Grupo	Altura do vilo (µm)	Diâmetro da base do vilo (µm)	Diâmetro do meio do vilo (µm)	Diâmetro do ápice do vilo (µm)	Altura vilo/largura vilo (µm)
ATM	352,19±63,96 ^{ab}	100,79±10,06 ^a	99,11±6,78 ^a	77,00±8,17 ^a	3,55±0,62 ^a
ACM	324,87±36,71 ^a	106,22±13,71 ^{ab}	102,45±10,95 ^a	78,66±8,94 ^a	3,20±0,52 ^a
ATF	364,57±6,75 ^{ab}	110,50±12,36 ^{ab}	105,60±5,63 ^a	76,91±2,53 ^a	3,47±0,24 ^a
ACF	372,37±73,03 ^{ab}	112,28±10,54 ^{ab}	108,00±8,84 ^a	83,95±9,37 ^a	3,47±0,77 ^a
BTM	378,60±75,38 ^{ab}	110,64±11,34 ^{ab}	103,61±9,61 ^a	76,23±6,27 ^a	3,71±0,93 ^a
BCM	356,47±59,06 ^{ab}	122,49±10,72 ^b	111,41±13,78 ^a	78,40±8,94 ^a	3,28±0,89 ^a
BTF	389,14±24,73 ^{ab}	103,92±11,52 ^{ab}	97,35±7,72 ^a	74,09±4,80 ^a	4,02±0,39 ^a
BCF	452,89±44,61 ^b	99,95±4,61 ^a	98,34±5,12 ^a	73,64±5,62 ^a	4,62±0,54 ^a

Médias± desvio padrão. Médias na coluna seguidas por mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo Teste de Newman-Keuls.

3. Superfície de absorção

Não foram encontradas diferenças entre as médias de superfície de absorção no duodeno entre os grupos considerando o tratamento, o sexo e as linhagens. Na relação altura do vilo/altura da cripta, a média do grupo BCF foi maior em relação a BCM assim como em relação a ACF, diferenças estas relacionadas a linhagem e ao sexo dos camundongos.

Quanto ao epitélio absorptivo foram encontradas diferenças relacionadas ao tratamento, em que a média para o grupo ACM foi maior em relação a ATM, e ACF maior em relação a ATF. Outras diferenças encontradas foi com relação a linhagem dos camundongos. A média de BTM, maior em relação a ATM; BTF maior em relação a ATF (Tabela 10; Figuras 13 e 15).

Tabela 10: Morfometria da superfície de absorção do duodeno.

Grupo	Superfície de absorção (µm ²) ^{ab}	Altura do vilos/ Altura da cripta	Altura do epitélio absorptivo (µm)
ATM	35003,84±7075,65 ^{ab}	2,83±0,30 ^a	27,86±2,20 ^b
ACM	33268,64±4909,77 ^b	2,84±0,24 ^a	33,93±1,17 ^a
ATF	38470,88±1389,32 ^{ab}	2,98±0,33 ^a	28,37±1,55 ^b
ACF	40180,77±8198,84 ^{ab}	2,99±0,81 ^a	34,45±2,56 ^a
BTM	38894,80±6589,39 ^{ab}	2,93±0,50 ^a	32,68±2,77 ^a
BCM	39204,02±3674,15 ^{ab}	2,92±0,63 ^a	36,19±2,92 ^a
BTF	37906,34±4084,68 ^{ab}	3,46±0,19 ^{ab}	32,92±1,41 ^a
BCF	44539,42±4868,16 ^a	3,86±0,26 ^b	34,04±1,35 ^a

Médias± desvio padrão. Médias na coluna seguidas por mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo Teste de Newman-Keuls.

4. Morfometria da mucosa

A morfometria da mucosa do duodeno não revelou diferenças entre os grupos, considerando o tratamento proposto, a linhagem ou o sexo dos camundongos (Tabela 11; Figuras 13 e 15).

Tabela 11: Morfometria da mucosa do duodeno.

Grupo	Espessura da mucosa basal (µm)	Espessura da mucosa total (µm)
ATM	122,62±45,16 ^a	449,13±139,80 ^a
ACM	113,37±9,57 ^a	458,27±43,24 ^a
ATF	132,13±11,40 ^a	526,64±23,96 ^{ab}
ACF	124,68±19,02 ^a	506,84±47,33 ^{ab}
BTM	119,24±9,59 ^a	495,90±93,54 ^{ab}
BCM	113,73±18,85 ^a	482,48±43,41 ^{ab}
BTF	113,81±11,17 ^a	505,68±54,20 ^{ab}
BCF	121,58±15,35 ^a	604,43±69,52 ^b

Médias± desvio padrão. Médias na coluna seguidas por mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo Teste de Newman-Keuls.

5. Morfometria da túnica muscular

A morfometria da túnica muscular e das subcamadas musculares não revelou diferenças entre os grupos, considerando o tratamento proposto, a linhagem ou o sexo dos camundongos (Tabela 12; Figuras 13 e 15).

Tabela 12: Morfometria das camadas musculares do duodeno.

Grupo	Espessura da muscular externa (μm)	Espessura da muscular interna (μm)	Espessura total da muscular (μm)
ATM	24,52 \pm 7,02 ^a	26,62 \pm 9,35 ^a	49,29 \pm 14,19 ^a
ACM	22,97 \pm 2,47 ^a	24,70 \pm 2,89 ^a	47,62 \pm 5,09 ^a
ATF	27,51 \pm 2,37 ^a	32,18 \pm 5,05 ^a	60,72 \pm 7,28 ^a
ACF	29,15 \pm 6,11 ^a	32,68 \pm 4,43 ^a	62,74 \pm 12,66 ^a
BTM	24,09 \pm 3,23 ^a	27,53 \pm 2,79 ^a	51,69 \pm 6,01 ^a
BCM	26,04 \pm 4,41 ^a	29,22 \pm 4,82 ^a	54,20 \pm 8,09 ^a
BTF	23,77 \pm 2,35 ^a	28,05 \pm 3,07 ^a	51,47 \pm 4,65 ^a
BCF	25,47 \pm 2,33 ^a	29,82 \pm 3,91 ^a	56,86 \pm 8,31 ^a

Médias \pm desvio padrão. Médias na coluna seguidas por mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo Teste de Newman-Keuls.

6. Morfometria da cripta de Lieberkühn

A morfometria da cripta não mostrou alteração entre os grupos para as médias de comprimento, diâmetro da base e largura das criptas. Foi observada diferença estatisticamente significativa nas médias do diâmetro do ápice das criptas. A média foi maior nos grupos ACM em relação à ATM, ACF em relação à ATF e BCM em relação à BTM (Tabela 13; Figuras 13 e 15).

Tabela 13: Morfometria da cripta de Lieberkühn no duodeno.

Grupo	Comprimento da cripta (μm)	Diâmetro da base da cripta (μm)	Largura da cripta (μm)	Diâmetro do ápice da cripta (μm)
ATM	125,25 \pm 25,27 ^a	38,44 \pm 1,65 ^a	40,78 \pm 2,74 ^a	38,40 \pm 2,44 ^a
ACM	114,37 \pm 8,04 ^a	37,30 \pm 3,39 ^a	42,31 \pm 3,40 ^a	44,12 \pm 2,81 ^b
ATF	124,10 \pm 10,68 ^a	35,73 \pm 1,48 ^a	39,32 \pm 2,23 ^a	38,74 \pm 1,25 ^a
ACF	127,09 \pm 15,34 ^a	37,50 \pm 2,46 ^a	41,42 \pm 2,41 ^a	44,97 \pm 4,23 ^b
BTM	130,01 \pm 21,93 ^a	34,55 \pm 1,87 ^a	38,37 \pm 2,59 ^a	37,08 \pm 1,25 ^a
BCM	123,67 \pm 15,03 ^a	37,18 \pm 3,13 ^a	39,20 \pm 4,81 ^a	44,37 \pm 4,35 ^b
BTF	112,68 \pm 8,34 ^a	35,43 \pm 1,71 ^a	39,41 \pm 1,78 ^a	41,39 \pm 1,95 ^{ab}
BCF	117,38 \pm 10,34 ^a	36,45 \pm 0,71 ^a	39,15 \pm 0,75 ^a	41,82 \pm 1,35 ^{ab}

Médias \pm desvio padrão. Médias na coluna seguidas por mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo Teste de Newman-Keuls.

7. Linfócitos intraepiteliais e enterócitos

Na frequência de enterócitos no vilão, foram encontradas diferenças relacionadas ao sexo e a linhagem dos camundongos. A média do grupo BCF foi maior em relação a BCM e também em relação a ACF. Não foram observadas diferenças entre as médias para a frequência de linfócitos intraepiteliais ou na relação entre estas frequências (Tabela 14, Figuras 13 e 15).

Tabela 14: Frequência de enterócitos e linfócitos intraepiteliais no duodeno.

Grupo	Enterócitos	Linfócitos intraepiteliais	Enterócito/ Linfócito intraepitelial
ATM	103,37±19,19 ^a	16,67±5,84 ^a	7,24±3,85 ^a
ACM	84,40±14,94 ^a	11,50±3,30 ^a	7,53±1,05 ^a
ATF	100,28±9,31 ^a	14,39±3,37 ^a	7,25±0,90 ^a
ACF	100,88±18,23 ^a	13,92±3,45 ^a	7,40±0,90 ^a
BTM	96,77±11,96 ^a	15,50±1,69 ^a	6,38±1,57 ^a
BCM	91,17±22,23 ^a	17,17±6,05 ^a	5,66±1,65 ^a
BTF	111,71±19,34 ^{ab}	18,38±3,36 ^a	6,20±1,15 ^a
BCF	130,00±4,09 ^b	18,67±4,57 ^a	7,48±2,21 ^a

Médias± desvio padrão. Médias na coluna seguidas por mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo Teste de Newman-Keuls.

8. Quantificação das células caliciformes e células de Paneth por mm² de mucosa

Não foram encontradas células secretoras apenas de mucinas ácidas (AB⁺) nas preparações histológicas analisadas. A quantificação não mostrou diferença nas médias de células secretoras de mucinas neutras (PAS⁺) entre os grupos (Tabela 15; Figuras 14 e 16).

Em relação às células cuja secreção é uma mistura de mucinas neutras e ácidas (AB⁺PAS⁺), foram encontradas diferenças relacionadas ao tratamento proposto, em que a média de BTM foi maior em relação a BCM, e BTF maior em relação a BCF. Também foram encontradas diferenças relacionadas a linhagem e ao sexo dos camundongos. A média de BTM encontrada foi maior em relação a BTF; BTM foi maior em relação a ATM; e BTF foi maior em relação a ATF (Tabela 15; Figuras 14 e 16).

A frequência de células de Paneth foi maior no grupo BCM em relação ao grupo BCF; em ACF foi maior em relação a BCF; e em BTF foi maior em relação a BCF (Tabela 15; Figuras 14 e 16).

Tabela 15: Tipos celulares secretores e célula de Paneth por mm² de mucosa no duodeno.

Grupo	PAS ⁺	AB ⁺ PAS ⁺	Célula de Paneth
ATM	14,76±15,72 ^a	172,90±32,38 ^a	28,35±16,39 ^b
ACM	3,40±1,77 ^a	220,32±14,24 ^a	48,23±13,31 ^b
ATF	6,77±2,48 ^a	207,57±28,13 ^a	53,77±14,75 ^b
ACF	7,58±1,90 ^a	216,73±25,10 ^a	31,10±15,05 ^b
BTM	10,05±6,56 ^a	267,86±54,99 ^c	33,29±13,23 ^b
BCM	11,73±13,83 ^a	226,64±27,16 ^a	27,70±5,80 ^b
BTF	11,46±8,18 ^a	265,22±11,31 ^b	32,16±6,34 ^b
BCF	6,67±3,09 ^a	192,12±30,56 ^a	15,94±2,72 ^a

Médias± desvio padrão. Médias na coluna seguidas por mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo Teste de Newman-Keuls.

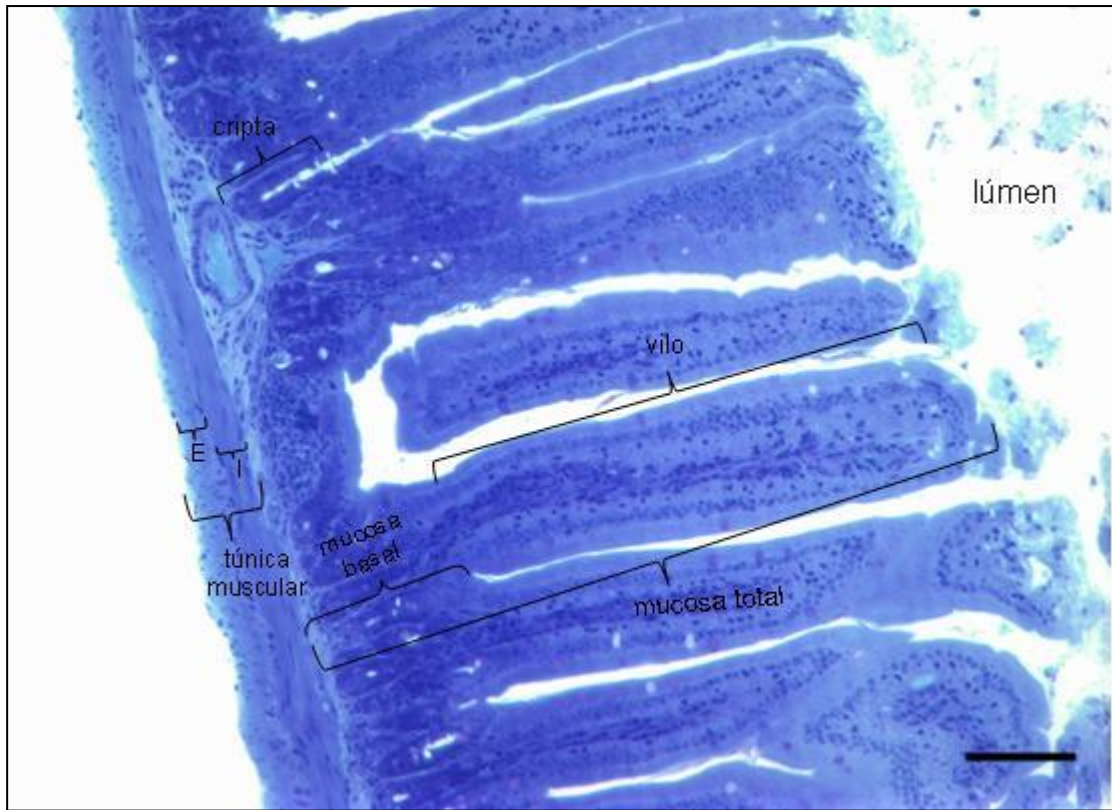


Figura 13: Secção transversal do duodeno com destaque para o vilo, cripta, mucosa e túnica muscular (camada muscular externa (E) mais camada muscular interna (I). Azul de Toluidina Borato de Sódio 1%. Barra: 100µm.

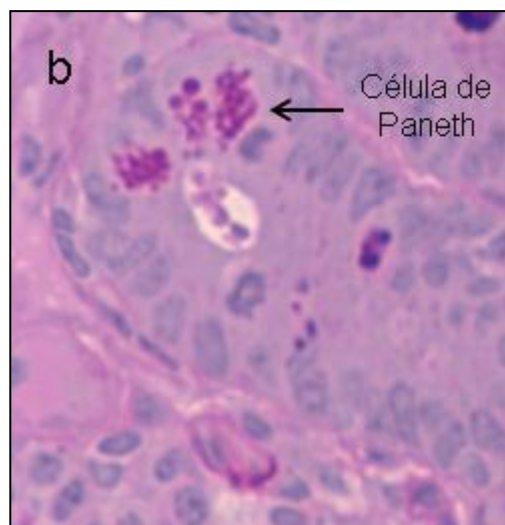
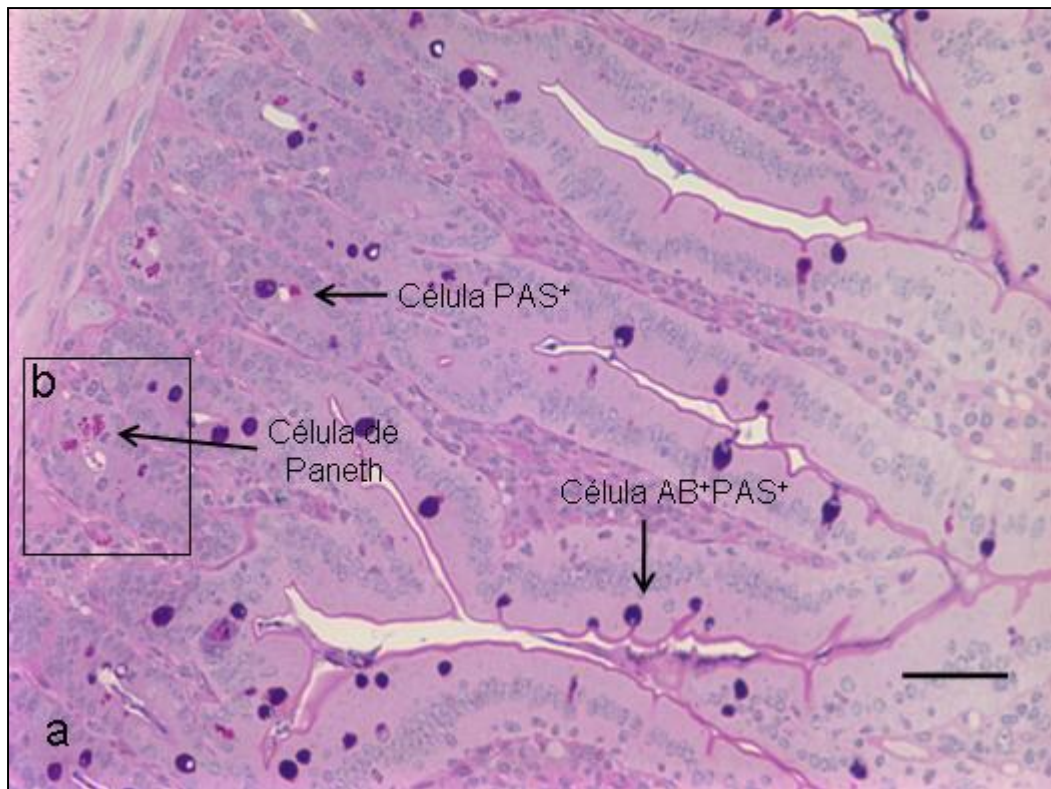


Figura 14: Secção transversal do duodeno com destaque para as células caliciformes localizadas ao longo das criptas e vilos, com o muco evidenciado pela técnica (a), e célula de Paneth, localizadas na base das criptas e cujos grânulos são evidenciados pela técnica (b). O quadro delimitando a base da cripta apresenta-se em destaque mostrando as células de Paneth, com maior visualização de seus grânulos, localização basal e morfologia (b). Técnica combinada de Azul de Alcian e PAS. Barra: 50µm

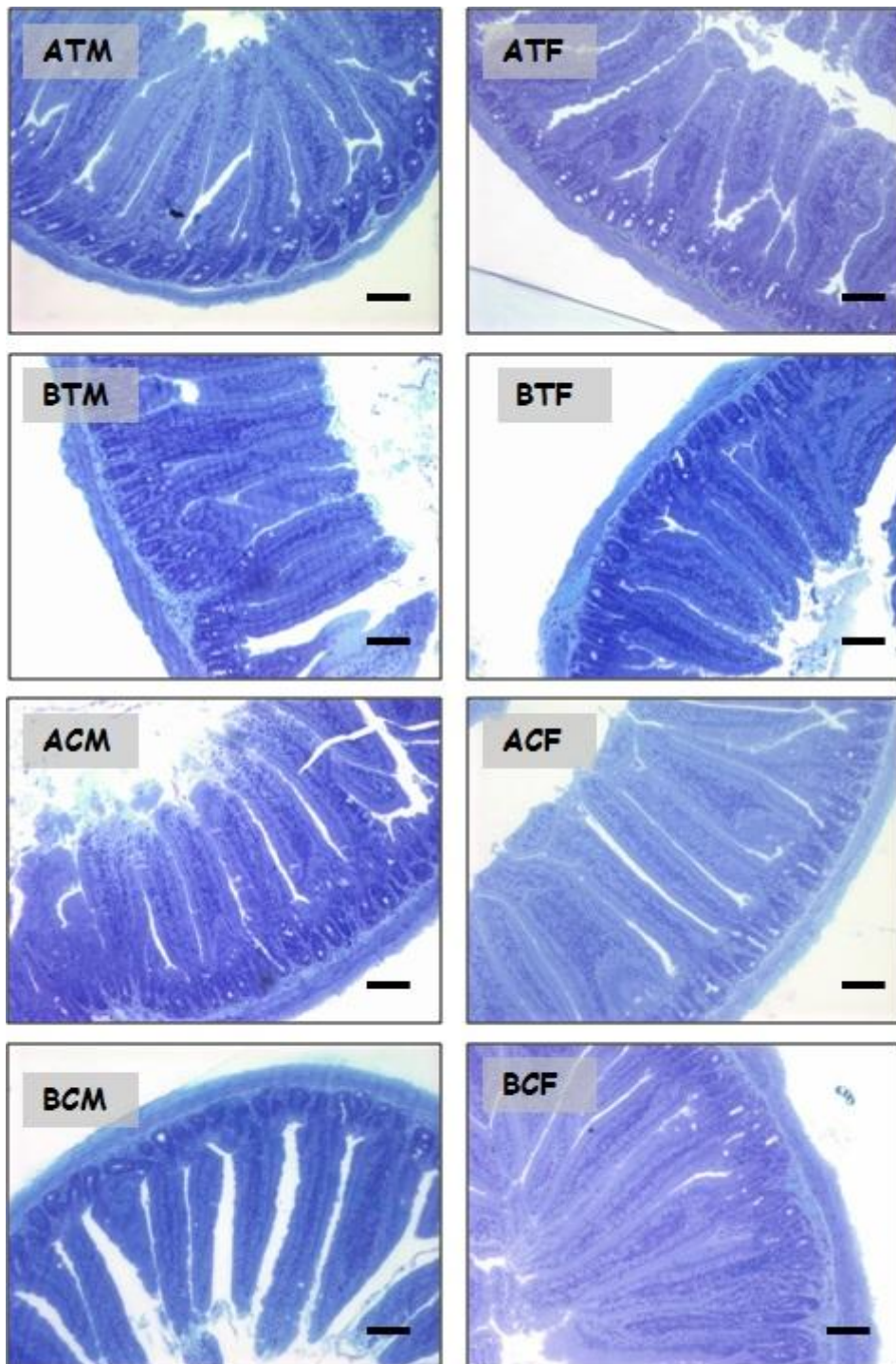


Figura 15: Secções transversais do duodeno representando os oito tratamentos. Azul de Toluidina Borato de Sódio 1%. Barra: 100µm.

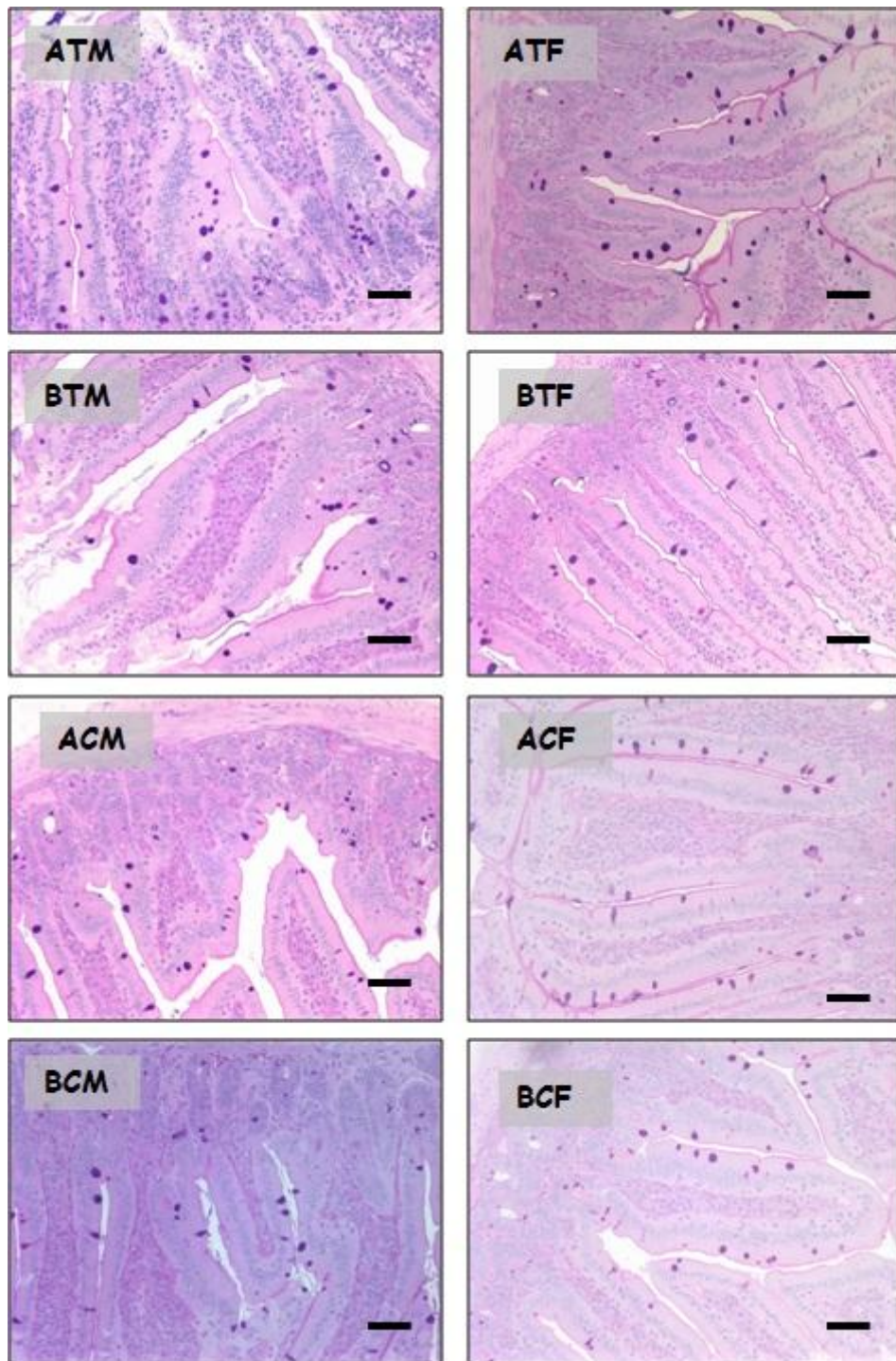


Figura 16: Secções transversais do duodeno representando os oito tratamentos. Técnica combinada de Azul de Alcian e PAS. Barra: 50 μ m.

Avaliação histomorfométrica do fígado

1. Morfologia do fígado

Com este tratamento, não foram encontrados indícios de que o óleo extraído das sementes de sacha kiruma possa alterar a estrutura histológica do tecido hepático seja em animais *knockout* para o gene *Apo-E*, seja em animais selvagens BlackC57/6. Foi observado que em animais *knockout* as gotículas lipídicas eram mais frequentes. Os cordões de hepatócitos possuíam a morfologia encontrada entre os mamíferos, assim como os componentes do meio intercelular (Figuras 17 e 18).

2. Morfometria dos hepatócitos

Na observação da frequência de hepatócitos mononucleados foram encontradas diferenças relacionadas ao sexo e a linhagem dos indivíduos, mas não relacionadas ao tratamento proposto. A frequência de hepatócitos mononucleados foi maior em ACF em relação a ACM; foi maior em BCM em relação a ACM; e foi maior em BCF em relação a ACF (Tabela 16; Figuras 17 e 18).

Na frequência de hepatócitos binucleados, por outro lado, foram encontradas diferenças ligadas a linhagem dos animais. As médias no grupo BCF foram maiores em relação a ACF; e em BTF foram maiores em relação a ATF. Não foram observadas diferenças em relação a áreas correspondendo ao citoplasma de hepatócitos.

Considerando a quantificação de gotículas lipídicas, foram observadas maiores médias no grupo ACF, em relação a BCF (Tabela 16; Figuras 17 e 18).

Tabela 16: Quantificação dos componentes celulares no fígado.

Grupo	Hepatócito			
	Mononucleado	Binucleado	Citoplasma	Gotículas lipídicas
ATM	13,60±1,60 ^{ab}	4,14±1,61 ^{ad}	197,22±19,00 ^{ab}	24,66±16,05 ^{ac}
ACM	10,84±1,35 ^b	4,96±2,64 ^{bd}	188,84±24,69 ^{ab}	22,74±6,08 ^{ab}
ATF	13,93±1,33 ^{ab}	4,27±0,18 ^{ad}	198,67±5,56 ^{ab}	21,87±4,00 ^{acd}
ACF	14,72±1,32 ^a	4,32±1,29 ^d	177,02±8,34 ^b	31,14±8,06 ^a
BTM	14,36±2,67 ^{ab}	6,80±1,88 ^{cd}	193,00±13,97 ^{ab}	10,04±6,60 ^{bc}
BCM	15,96±4,06 ^{ac}	7,12±1,64 ^{bc}	193,58±8,17 ^{ab}	13,50±8,23 ^{bc}
BTF	16,68±0,92 ^{ac}	7,70±0,87 ^c	203,52±3,88 ^a	8,06±4,24 ^{bd}
BCF	18,58±1,63 ^c	9,15±0,96 ^c	190,75±4,88 ^{ab}	10,93±2,94 ^{bc}

Médias± desvio padrão. Médias na coluna seguidas por mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo Teste de Newman-Keuls.

3. Morfometria de outros componentes do fígado

Na frequência de áreas com sinusóides, foram observadas maiores médias no grupo BCF em relação a BCM; BCF em relação a ACF; e BCF em relação a BTF. Na frequência de macrófagos, as médias encontradas em BCM foram maiores em relação a BCF; ACF em relação a BCF; em BTM também foram maiores em relação a ATM e também maiores em BTF em relação a BCF (Tabela 17; Figuras 17 e 18).

Nas áreas com necrose e na frequência de vasos sanguíneos não foram observadas diferenças entre os grupos (Tabela 17; Figuras 17 e 18).

Tabela 17: Frequência dos componentes intercelulares no fígado.

Grupo	Sinusóide	Macrófago	Necrose	Vasos sanguíneos
ATM	12,94±3,86 ^a	6,34±2,62 ^{ac}	1,34±2,67 ^a	5,18±2,87 ^a
ACM	15,70±5,39 ^{ab}	9,46±2,98 ^{ab}	0,98±2,19 ^a	4,48±0,72 ^a
ATF	17,20±5,18 ^{ab}	7,43±2,38 ^{ab}	0,00±0,00 ^a	2,63±1,90 ^a
ACF	19,80±3,47 ^{ab}	10,74±4,15 ^{ab}	0,20±0,31 ^a	8,06±2,44 ^a
BTM	20,82±6,35 ^{ab}	11,50±1,68 ^b	3,32±6,15 ^a	6,16±5,05 ^a
BCM	22,94±3,41 ^b	7,06±2,05 ^{ab}	0,56±0,58 ^a	5,28±3,00 ^a
BTF	14,48±3,25 ^a	7,90±0,91 ^{ab}	1,14±2,22 ^a	6,52±2,12 ^a
BCF	28,83±1,49 ^c	3,10±2,08 ^c	0,85±0,78 ^a	3,83±0,96 ^a

Médias± desvio padrão. Médias na coluna seguidas por mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo Teste de Newman-Keuls.

4. Diâmetro celular e nuclear de hepatócitos

Na morfometria dos hepatócitos, não foram encontradas diferenças entre os grupos para os diâmetros nuclear e celular, e nem na relação entre estes valores (Tabela 18; Figuras 17 e 18).

Tabela 18: Diâmetros nuclear e celular dos hepatócitos.

Grupo	Diâmetro nuclear de hepatócitos (µm)	Diâmetro celular de hepatócitos (µm)	Relação diâmetro celular/ diâmetro nuclear
ATM	43,98±2,82 ^a	97,95±11,84 ^a	2,24±0,33 ^a
ACM	44,81±1,63 ^a	98,96±7,19 ^a	2,21±0,10 ^a
ATF	45,37±2,21 ^a	97,88±4,76 ^a	2,16±0,02 ^a
ACF	46,46±3,83 ^a	91,92±7,25 ^a	1,98±0,08 ^a
BTM	42,31±2,84 ^a	89,96±5,02 ^a	2,13±0,16 ^a
BCM	45,91±3,41 ^a	91,16±1,88 ^a	1,99±0,16 ^a
BTF	45,49±2,26 ^a	93,88±6,03 ^a	2,07±0,13 ^a
BCF	45,50±2,68 ^a	94,76±2,40 ^a	2,09±0,08 ^a

Médias± desvio padrão. Médias na coluna seguidas por mesma letra não diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo Teste de Newman-Keuls.

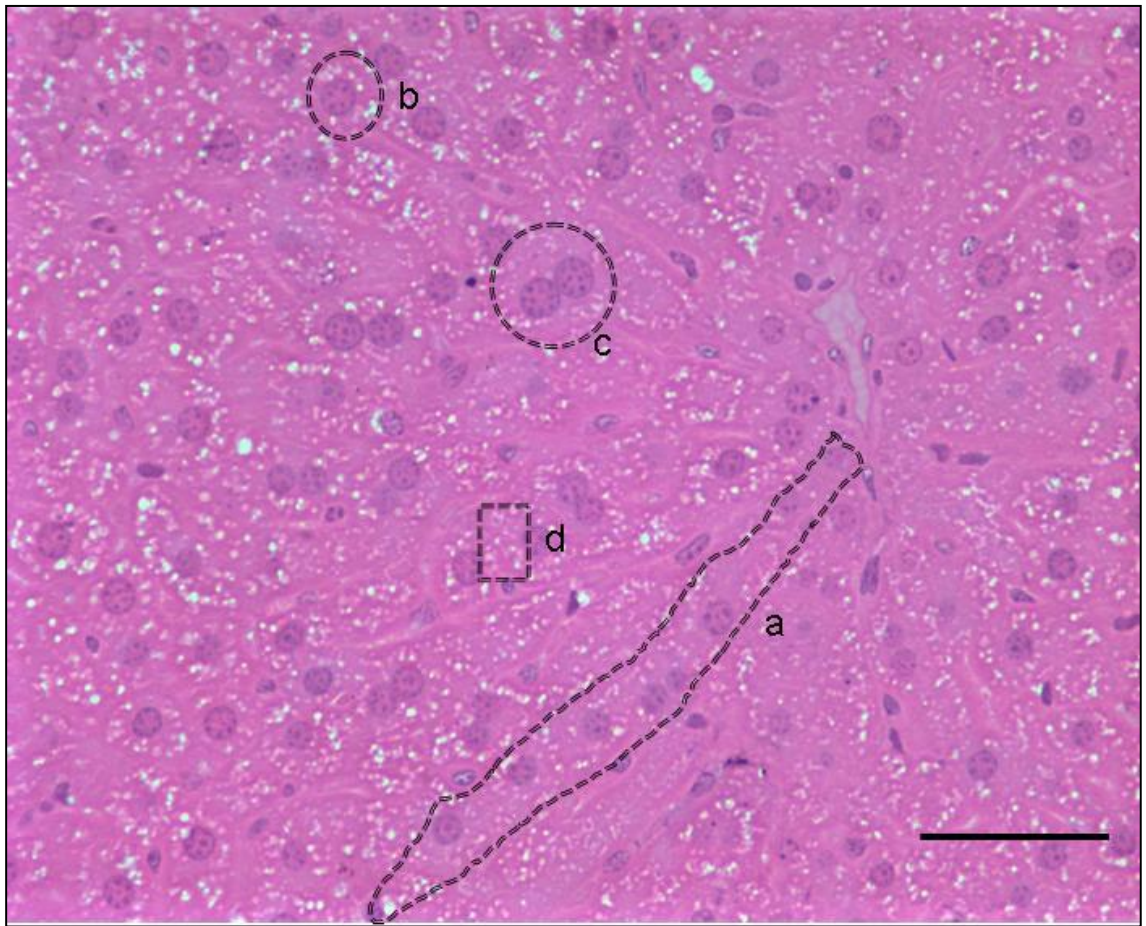


Figura 17: Secção transversal do fígado com destaque para o cordão de hepatócitos delimitado (a), hepatócito mononucleado (b), hepatócito binucleado (c) e porção de citoplasma de hepatócito rica em gotículas lipídicas (d). Hematoxilina- Eosina. Barra: 50µm.

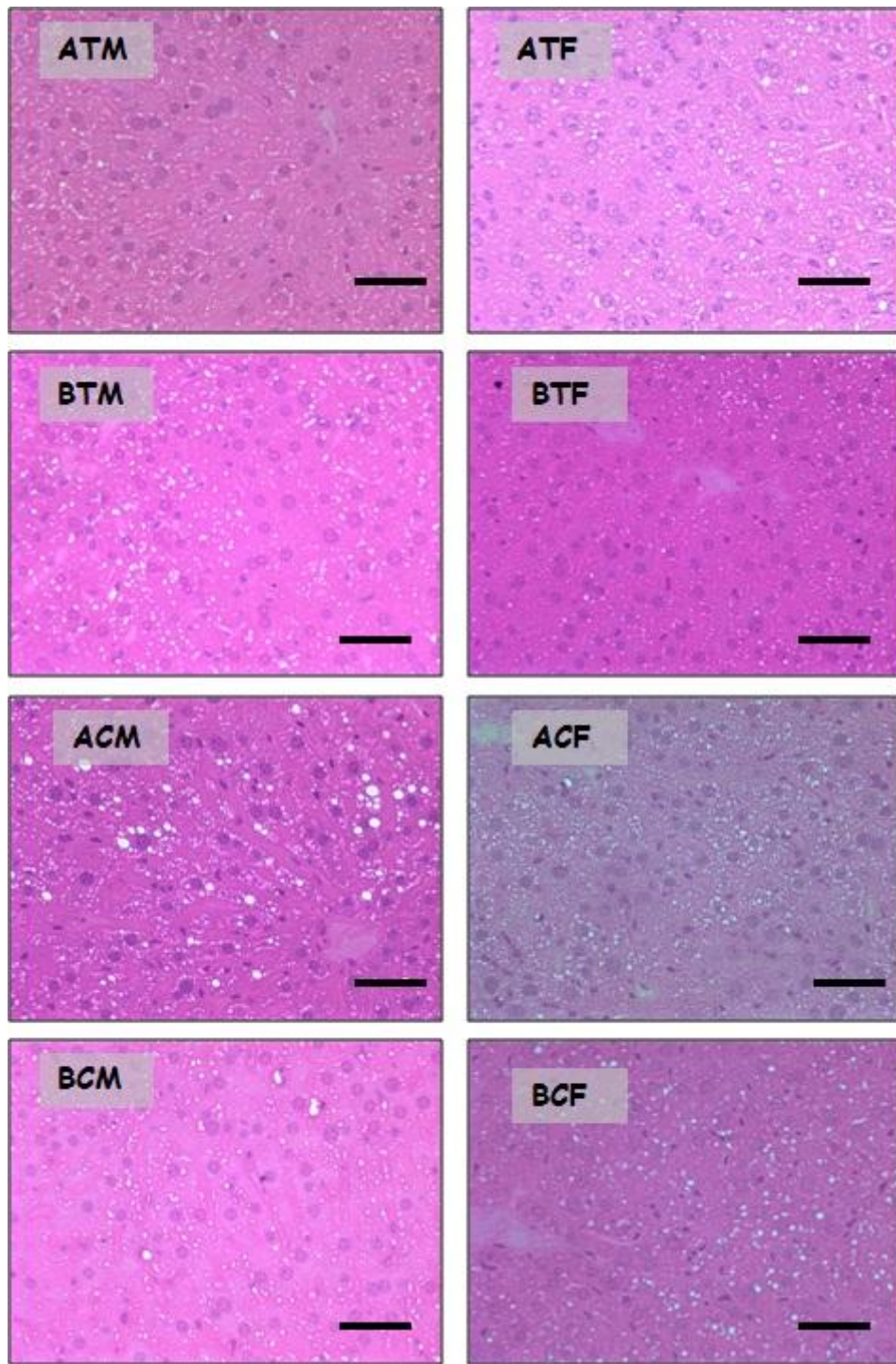


Figura 18: Secções do fígado representando os oito tratamentos. Hematoxilina- Eosina. Barra: 50µm.

Discussão dos resultados

1. Extração e avaliação do óleo de sacha kiruma

Com a metodologia empregada, foi obtido neste trabalho 38,08% de eficiência, sendo preciso salientar que o hexano extrai toda a fração lipídica (FOLLEGATTI ROMERO, 2007). Segundo Axtell & Fairman (1992), o teor lipídico destas sementes varia entre 35 a 60%, o que corrobora o resultado obtido neste trabalho (Tabela 5). Nas mesmas condições, segundo Hamaker (1992), o teor lipídico das sementes de sacha kiruma é cerca de 54% e de acordo com Follegatti Romero (2007) foi de $54,3 \pm 2\%$, que segundo este autor é concordante com os valores obtidos em estudos anteriores.

A composição e o perfil de ácidos graxos do óleo de sacha kiruma foram determinados por Hamaker et al. (1992), em trabalho pioneiro. O grupo encontrou a seguinte composição: 45,2% de ácido α -linolênico (ω -3), 36,8% de ácido linoléico (ω -6), 9,60% de ácido oléico (ω -9) e 7,7% de ácidos graxos saturados. Destes mesmos ácidos, foram encontrados na amostra deste estudo os seguintes percentuais: 34,90% de ácido linoléico, 6,37% de ácido oléico e 4,42% de ácidos graxos saturados (Tabela 6). No óleo obtido para este estudo não encontramos o ácido graxo α -linolênico, apenas o γ -linolênico (0,06%) (Tabela 6). Segundo Follegatti Romero (2007), a extração por solventes pode gerar a deterioração de α -linolênico na extração e refino devido ao uso de altas temperaturas. A condição deste óleo concorda com a literatura neste aspecto. O que torna este óleo especial é sua alta concentração de ácidos graxos insaturados, destacando o ω -3 (ácido linolênico) e o ω -6 (ácido linoléico). Como já exposto, os ácidos graxos das famílias ω -6 e ω -3 são obtidos por meio da dieta ou produzidos pelo organismo a partir dos ácidos linoléico e α -linolênico, pela ação de enzimas *elongase* e *dessaturase* (MARTIN, 2006).

Os ácidos graxos das famílias ω -6 e ω -3 encontram-se relacionados com a prevenção de doenças cardiovasculares, por meio da redução dos níveis de triglicerídeos e colesterol sanguíneo, aumentando a fluidez sanguínea e reduzindo a pressão arterial (ANJO, 2004). O óleo extraído das sementes de sacha kiruma é uma excelente fonte de ácidos graxos poliinsaturados, compostos principalmente pelo linolênico (C18:3n3) e linoléico (C18:2n6), e seus subprodutos. No óleo obtido para este estudo, foram encontrados 95,48% de ácidos graxos poliinsaturados. Segundo Hamaker et al. (1992), esta porcentagem foi 82%. Segundo o mesmo autor, o óleo de sacha kiruma possui cerca de 91,6% de ácidos graxos insaturados, tornando-o o óleo com maior concentração de insaturados conhecida. A quantidade de ácidos graxos poliinsaturados encontrados no presente estudo concorda, então, com os dados da literatura consultada. A extração por Soxhlet tem alto rendimento, em torno de 54,3% mas, pode reduzir a quantidade de ácidos graxos poliinsaturados no óleo devido a oxidação pela exposição as altas temperaturas (PRADO et al., 2011). Esta situação não foi encontrada neste ensaio, como comprovado pela alta concentração de poliinsaturados encontrada, 95,48%.

Segundo as recomendações de órgãos da saúde, a razão entre as somatórias dos ácidos graxos poliinsaturados e saturados deve ser maior que 0,45, para serem consideradas saudáveis em relação às doenças cardíacas (CALDERELLI et al., 2008; YUNES, 2010). O óleo de sacha kiruma apresentou razão poliinsaturados/saturados

igual a 8,10 (Tabela 7). Este dado indica que este óleo manteria os benefícios em relação a prevenção de doenças cardiovasculares já descritos na literatura consultada.

2. Evolução do consumo alimentar e massa corporal dos camundongos durante o ensaio biológico

Nas primeiras duas semanas é aceitável uma alteração do padrão de alimentação devido à adaptação dos animais as novas acomodações. Os camundongos neste estudo não apresentaram problemas com adaptação à dieta, mantendo médias semelhantes de consumo diário de dieta ao longo das semanas de ensaio, desde o início da oferta da mesma (Figura 11). A dieta foi armazenada seguindo recomendações, o que foi importante para evitar a oxidação dos ácidos graxos. Os animais apresentaram um desenvolvimento e comportamento semelhante ao longo das semanas.

O índice hepatossomático foi utilizado para avaliar o crescimento dos animais, uma vez que é o fígado o principal órgão do metabolismo lipídico, de formação das lipoproteínas e de armazenamento de vitaminas (BRITO, 2008; GUYTON, 1992). O seu aumento sugere um comprometimento no desenvolvimento normal desses animais, bem como índice de hepatotoxicidade (BRITO, 2008). A alteração encontrada neste valor para um dos grupos não pode ser atribuída ao tratamento proposto. Os resultados para o índice hepato-somático entre os grupos tratados e controles está de acordo e complementa os dados expostos (Tabela 8).

Em trabalho com óleo de aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) realizado por Silva et al. (2010), frangos de corte foram tratados com o óleo essencial extraído dos frutos, acrescido de antibióticos e também não encontraram diferenças no consumo alimentar entre os grupos. Estes dados estão de acordo com os dados do desenvolvimento ponderal ao longo do ensaio. A proporção se manteve ao longo das semanas, em acordo com o consumo da ração (Tabela 8). No mesmo experimento, Silva et al. (2010) encontraram ganho de massa e massa final superiores nos grupos tratados com o óleo de aroeira vermelha em relação aos controles. Segundo os autores, a maximização nesses índices zootécnicos parece indicar uma melhoria nos processos de digestão e absorção de nutrientes, tornando-os mais eficientes.

Alguns estudos sobre o consumo de nozes e amendoim em humanos, fontes de ácidos graxos poliinsaturados e monoinsaturados, respectivamente, verificaram que, embora esses alimentos sejam altamente energéticos, os voluntários estudados não aumentaram a massa tanto quanto o consumo energético (ALMARIO et al., 2001; HU et al., 1998; KRIS-ETHERTON et al., 1999; O'BYRNE et al., 1997; ZAMBÓN et al., 2000). Em outro estudo, Cintra (2003) também encontrou resultado semelhante em ratos (SALES et al., 2005).

3. Avaliação dos efeitos do tratamento no duodeno

A mucosa intestinal deve apresentar características morfofuncionais adequadas, pois os processos de absorção são dependentes da integridade do epitélio. Inúmeros agentes infecciosos ou não infecciosos podem lesar a mucosa intestinal, além de comprometer os processos digestórios (SILVA et al., 2010). De acordo com Macari et al. (2002), a capacidade absorptiva do intestino é proporcional ao número de vilosidades ali presentes. A manutenção do tamanho dos vilos garante a manutenção da capacidade

digestiva e de absorção intestinal (PELICANO et al., 2003). As observações da morfometria das vilosidades indicam que o óleo de sacha kiruma não alterou a capacidade absorptiva do duodeno (Tabela 9, Figuras 13 e 15). Para complementar esta informação, tem-se os dados de superfície de absorção, em que não foram encontradas diferenças entre os grupos (Tabela 10, Figuras 13 e 15).

A relação altura do vilo/ largura do vilo também não mostrou diferenças entre os tratamentos (Tabela 10, Figuras 13 e 15). Silva et al. (2010), no trabalho realizado com o óleo de aroeira vermelha e antibióticos em frangos de corte encontraram maior altura de vilosidades em frangos tratados com o óleo, confirmando que o aumento do ganho de massa e massa final estavam condicionados ao aumento da superfície de absorção considerada, corroborando a literatura. Este grupo verificou, entretanto, que não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$) para a relação vilo/cripta do jejuno dos animais.

Segundo Macari (1999), a relação desejável entre vilosidades e criptas intestinais é quando as vilosidades se apresentam altas e as criptas rasas. Neste trabalho, o tratamento com o óleo das sementes de sacha kiruma não alterou esta relação. Foram encontrados vilos com altura de duas a três vezes maiores em relação à altura das criptas, confirmando Macari (1999). Se o processo de reposição celular for adequado, o valor da relação altura da vilosidade e profundidade de cripta é maior, indicando presença de maior número de enterócitos maduros e funcionais (TUCCI, 2003). Sabe-se ainda que o aumento da perda celular nas vilosidades resulta em aumento da profundidade de criptas (TUCCI, 2003), que devem assegurar uma adequada taxa de renovação celular e garantir a reposição das células na região apical dos vilos (PLUSKE et al., 1997). Desta forma, quanto maior a altura das vilosidades e menor a profundidade das criptas, mais eficientes serão os processos de digestão e absorção de nutrientes e menores as perdas energéticas com o *turnover* celular (AUGUSTO, 2009). Os dados deste trabalho concordam com aqueles presentes na literatura. Não foram encontradas diferenças entre os grupos para a morfometria das criptas de Lieberkühn que possa ser diretamente atribuída ao tratamento proposto. A diferença encontrada para o diâmetro do ápice das criptas não interfere na função de reposição celular, atribuída a esta estrutura (Tabela 13; Figuras 13e 15). Silva et al. (2010) em seu trabalho com jejuno de frangos tratados com antibióticos e óleo de aroeira vermelha não encontraram alteração neste parâmetro.

De acordo com Boleli et al. (2002) a taxa de digestão e absorção intestinal estão diretamente relacionados com as taxas de proliferação e diferenciação celular, pois quanto maiores os vilos e sua densidade, maiores serão as áreas de digestão e absorção (ANTUNES, 2008). Como se sabe, a altura de vilos está diretamente relacionada ao número dos diferentes tipos de células presentes no epitélio intestinal. Considera-se que o número de enterócitos assim como a altura e o número de microvilos e estrutura da membrana determinam a dimensão da superfície da digestão e absorção intestinal (ANTUNES, 2008; UNI, 2000).

Na quantificação dos enterócitos nos vilos não foram encontradas diferenças que sugerem uma atuação do óleo de sacha kiruma neste aspecto (Tabela 14, Figuras 13 e 15) resultado concordante com dados de superfície de absorção e morfometria de vilos já apresentados. A observação da frequência de linfócitos intraepiteliais também não

mostrou diferenças entre os grupos, sugerindo ausência de processos inflamatórios no duodeno. Outro tipo celular analisado, a célula de Paneth, teve sua frequência aumentada no grupo BTF em relação à BCF (Tabela 15; Figuras 14 e 16). Entretanto, este resultado isolado não permite afirmar que seja devido ao uso do óleo de sacha kiruma. As células de Paneth contribuem para a função da barreira intestinal pela liberação de grânulos contendo diversas substâncias antimicrobianas (CARLOS, 2006).

Com relação às células caliciformes, não foram encontradas células secretoras apenas de mucinas ácidas não sulfatadas (AB^+) nas preparações histológicas analisadas e não foram encontradas diferenças entre os grupos na frequência de células secretoras apenas de mucinas neutras (PAS^+) (Tabela 15; Figuras 14 e 16). Considerando que os mucopolissacarídeos ácidos protegem contra a translocação bacteriana (FONTAINE et al, 1996), a ausência deste tipo celular no duodeno pode estar ligada ao fato de que a concentração de microorganismos nesta região ser muito baixa. Quando se observa a frequência de células secretoras de uma mistura de mucinas ácidas e neutras (AB^+PAS^+) foram encontradas diferenças ligadas a linhagem selvagem. Animais da linhagem selvagem tiveram médias maiores em relação a linhagem *knockout*, e em grupos que receberam o óleo de sacha kiruma foram encontradas maiores médias para a frequência deste tipo celular, em relação aos controles (Tabela 15; Figuras 14 e 16). Segundo Carlos (2006) os ácidos graxos de cadeia curta estimulam secreção das células caliciformes. O óleo utilizado neste ensaio não apresentou concentração de ácidos graxos de cadeia curta, mas estas diferenças podem ser atribuídas a um possível potencial estimulador dos ácidos graxos de cadeia longa, assim como acontece com os de cadeia curta. Battistelli et al. (2010) trabalharam com camundongos tratados durante 24 meses com soja geneticamente modificada e encontraram diferenças ligadas a dieta. A frequência de células secretoras de mucinas neutras e ácidas foram maiores nos grupos tratados, enquanto a frequência daquelas secretoras de mucinas neutras não alterou entre os grupos. A análise das células caliciformes se torna importante para se avaliar efeitos de diversos tipos de dietas, pois a quantidade e a qualidade das células caliciformes podem ser alteradas em função destas dietas, influenciando no processo de translocação bacteriana (CARLOS, 2006; FRANKEL et al, 1995).

Na mucosa intestinal do rato, a relação enterócito/ linfócito intraepitelial esperada é de 10:1 (ANTUNES, 2007). Neste trabalho com sacha kiruma esta relação variou entre aproximadamente 5:1 a 7:1 e não foram encontradas diferenças entre os grupos. Apesar destes dados, não foram valores suficientes para alterar a morfometria dos vilos e das criptas (Tabela 14, Figuras 13 e 15).

O tipo de alimentação determina variações na morfologia intestinal. Yasar & Forbes (1998) relataram que as características físicas e químicas das dietas modificam a integridade das células epiteliais da mucosa do tubo digestivo. A morfometria da mucosa complementa a morfometria do epitélio absorptivo. Para este tratamento não encontramos diferenças entre os grupos, indicando que o óleo de sacha kiruma, não altera os constituintes da mucosa do duodeno (Tabela 10; Figuras 13 e 15).

Outro ponto importante a se considerar é a motilidade intestinal. O trânsito do alimento no lúmen pode variar dependendo da qualidade deste alimento ou devido a problemas na musculatura ou inervação da mesma. Tanto a espessura das subcamadas musculares quanto a túnica muscular não foram alteradas com o tratamento (Tabelas 11

e 12; Figuras 13 e 15). Silva et al. (2010) com o trabalho com óleo de aroeira vermelha também não encontraram diferença significativa entre os tratamentos para a espessura da túnica muscular do jejuno.

4. Avaliação dos efeitos do tratamento no fígado

O fígado é o principal órgão responsável pela manutenção da homeostase metabólica, participa da biotransformação de metabólitos circulantes e na desintoxicação e excreção de resíduos metabólicos e de contaminantes externos. É um órgão muito susceptível a potenciais lesões por substâncias farmacêuticas e químicas, que podem provocar hepatotoxicidade (ALVARADO-RICO & CASTRO, 2010).

Diante de possíveis lesões a que o fígado é submetido, os hepatócitos contam com mecanismos eficientes para enfrentar as modificações ao seu entorno. Para manter a homeostase, o fígado responde, seja aumentando seu tamanho (hipertrofia) ou incrementando o número de células, por meio da divisão celular (hiperplasia), como resposta adaptativa ao estresse (ALVARADO-RICO & CASTRO, 2010).

Os hepatócitos têm como característica a presença de dois ou mais núcleos, e geralmente apresentam tamanho uniforme. A hipertrofia acontece quando estas células aumentam consideravelmente de tamanho, podendo ocorrer também o aumento do núcleo. A hipertrofia, tumefação ou aumento de células são achados morfológicos comuns em várias doenças inflamatórias do fígado, resultando de alterações funcionais na bomba de sódio com retenção citoplasmática deste e de água (LORA, 2007). A hiperplasia celular pode ser identificada com a maior frequência de hepatócitos binucleados, um indicativo da etapa final da divisão. Aumento na frequência de hepatócitos binucleados também pode indicar maior atividade metabólica do tecido. Neste ensaio não foram observadas diferenças entre a frequência de hepatócitos mononucleado e binucleado, entre os grupos que receberam o tratamento e seus grupos controles (Tabela 16; Figuras 17 e 18). Não foram encontradas, ainda, diferença nos diâmetros celular e nuclear ou na relação entre os diâmetros citoplasma/ núcleo, indicando que o tratamento não provoca alteração no volume celular ou nuclear dos hepatócitos (Tabela 17; Figuras 17 e 18).

Segundo Lora (2007), tanto o aumento do volume de hepatócitos e de seus núcleos quanto a necrose já foram verificados em quadros de intoxicação por *Arrabidaea bilabiata* L. (Bignoniaceae) (chibata) em coelhos; com frutos de *Melia azedarach* L. (Meliaceae) (cinamomo) em suínos e intoxicação por *Mascagnia* sp. (Malpighiaceae) (timbó). No presente trabalho, não foram observados indícios morfológicos de que o óleo extraído de sacha kiruma, oferecido na dose de lipídios diária recomendada para estes camundongos, possa causar dano na morfologia do fígado. Lora (2007) afirma ainda que, segundo Sherlock (1978), a hepatotoxicidade é relacionada com dose-dependência. Lora (2007) trabalhou com extrato hidroalcoólico de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (pitanga) em camundongos de ambos sexos e encontrou sinais de hepatotoxicidade dose-dependente. Encontrou alterações em hepatócitos e necrose nos grupos tratados em relação aos controles.

Batista et al., (2006) trabalharam com infusão de raízes de *Cayaponia tayuya* (Cucurbitaceae) (abóbora-d'anta) em camundongos swiss machos e encontraram vasos sanguíneos e sinusóides volumosos e congestos e áreas com necrose. No ensaio com

sacha kiruma não foram encontradas alterações na frequência e morfologia dos vasos sanguíneos e nem na frequência de áreas com necrose (Tabela 17; Figuras 17 e 18). Este resultado corrobora os resultados anteriores e indicam que nas condições deste ensaio, o óleo extraído das sementes de sachá kiruma não teria efeito hepatotóxico.

A esteatose é a forma inicial de lesão hepática sendo diagnosticada quando a gordura representa mais de 5% do peso do fígado (AGUIAR, 2008; STOUT et al., 2011). Caracteriza-se pelo acúmulo de triglicerídeos no citoplasma celular, na forma de gotículas de lipídeos, geralmente com a manutenção da função hepática. De acordo com Aguiar (2008), a esteatose hepática decorre de um conjunto de alterações: diminuição da oxidação dos lipídeos pelo fígado; aumento da lipogênese hepática; diminuição da síntese e liberação de lipoproteínas; aumento da mobilização de tecido hepático e aumento da entrada hepática dos lipídeos circulantes. Neste trabalho com sachá kiruma foi observada diferença na frequência das gotículas lipídicas no citoplasma entre os grupos que receberam o tratamento e os grupos controles. Foram encontradas diferenças relacionadas a linhagem dos camundongos. Camundongos da linhagem *knockout* do grupo controle apresentaram maior frequência de gotículas lipídicas no citoplasma em relação aos selvagens (Tabela 16; Figuras 17 e 18). Nestes indivíduos, a inflamação precoce do fígado e maior frequência de áreas com gotículas lipídicas já seriam esperadas devido ao defeito na síntese da apoproteína E (WOUTERS et al., 2008). A ausência de dado semelhante relacionado ao grupo tratado pode indicar, por outro lado, um efeito protetor do óleo de sachá kiruma neste aspecto.

Conclusões

1. O método de extração utilizando o hexano como solvente orgânico foi considerado eficiente para a extração de óleo das sementes de sacha kiruma; sendo que o rendimento de extração foi maior utilizando cartuchos com menor massa de amostra;
2. A composição de ácidos graxos do óleo extraído das sementes cultivadas em Viçosa (MG) foi similar àquela encontrada na literatura;
3. O consumo das dietas e a evolução ponderal dos grupos de camundongos controle e tratado com o óleo de sacha kiruma foi similar durante o ensaio biológico;
4. A estrutura histológica do duodeno e do fígado não mostrou alterações devido ao tratamento com o óleo.

Neste ensaio não encontramos sinais de toxidez do óleo extraído de sacha kiruma que pudesse inviabilizar seu consumo. Estudos futuros relacionando seu uso com a estrutura do sistema cardiovascular de animais deficientes em apoproteína E serão necessários para agregar novas informações. Além disso, seria interessante o desenvolvimento de estudo com dose-dependência, a fim de determinar uma faixa segura de consumo do óleo de sacha kiruma.

Anexos

Anexo I

Método de extração do óleo das sementes de *sacha kiruma* por Soxhlet utilizando o hexano como solvente

Foi utilizado um Extrator de gordura Soxhlet de 500ml. Inicialmente a amostra foi dividida em cartuchos de extração com 50g ou 100g cada, a fim de verificarmos se haveria diferença de rendimento no processo de extração. Cada bateria comportava seis cartuchos e foram necessárias seis baterias de 24 horas. Os cartuchos foram confeccionados com papel de Germinação de Sementes (28x38 cm com 65 g) e seu tamanho foi padronizado de acordo com o tamanho do Soxhlet. Os cartuchos foram acomodados no Soxhlet e o volume completado com Hexano. A temperatura da chapa aquecedora foi controlada durante todo o processo mantendo-se próximo a 69°C, dentro da faixa para a ebulição do hexano, que varia entre 68°C e 70°C. A temperatura da água do condensador também foi controlada durante todo o processo mantendo-se próximo a 16°C ±1°C.

O volume de solvente utilizado foi o suficiente para completar o volume do Soxhlet e permitir duas sifonagens, quando o solvente passa por toda a amostra e se deposita no balão de fundo chato acoplado, em torno de 400ml de hexano.

Princípio do método de extração: O hexano presente no balão de fundo chato, em contato com a placa aquecedora evapora, passando ao longo do Soxlet. Em contato com a água mais fria este vapor condensa e retorna ao balão de fundo chato. Neste percurso, o solvente lava a amostra contida no cartucho levando parte do óleo. Assim, ao final das 24 horas temos uma mistura do hexano com o óleo de *Sacha kiruma* no balão, e uma amostra livre de óleo nos cartuchos. Estes cartuchos foram recolhidos e armazenados em estufa a 45°C por 12 horas para posterior pesagem.

Anexo II

Descrição da destilação com Rotavapor a vácuo da amostra após o processo de extração por Soxhlet utilizando o hexano como solvente

Inicialmente, foi preciso padronizar todo o sistema com um balão de fundo redondo contendo apenas hexano. O sistema funcionou desta forma por cerca de 30 minutos e, posteriormente o balão foi trocado por um contendo nossa amostra. Como trabalhamos em um ambiente com vácuo, a evaporação do solvente ocorreu em uma temperatura abaixo de seu ponto de ebulição. Vale ressaltar que para o hexano, o ponto de ebulição é 69°C.

Iniciamos a etapa com uma temperatura de 30°C e, vagarosamente, foi aumentada para 40°C, 50°C e, finalmente, 55°C, mantendo-se até o final do processo. O balão de fundo redondo com a amostra ficava girando constantemente o que facilitou a evaporação do solvente.

O hexano evaporava da amostra, passava pelo condensador e, em contato com a água resfriada, condensava e caía no balão de fundo redondo para este fim. Tal solvente é considerado puro podendo ser novamente utilizado. Para a nossa extração foi utilizado apenas hexano novo.

Anexo III

Descrição da etapa de borbulhar nitrogênio na amostra obtida do processo de destilação com Rotavapor a vácuo

Após a destilação, a amostra de óleo foi retirada do balão de fundo redondo e armazenada em um kitasato. Este foi colocado em um banho-maria com temperatura controlada em 55°C por 10 minutos. Um cateter com uma seringa, adaptado a partir de um balão de nitrogênio foi introduzido nesse kitasato e, em constante e delicado movimento, borbulhou-se nitrogênio na amostra.

Anexo IV

Extração de lipídeos do óleo de sacha kiruma e obtenção dos ésteres dos ácidos graxos.

Método de Folch (1957) modificado:

- 1) Pesar a amostra em tubo de ensaio fresco e identificado. Para o óleo, utilizou-se 30mg,
- 2) Adicionar 1,0ml de clorofórmio: metanol e macerar com bastão de vidro, acrescentar 0,9ml de clorofórmio:metanol, lavando o bastão de vidro e retirando-o do tubo de ensaio,
- 3) Homogeneizar em vórtex por ± 3 min,
- 4) Adicionar 0,4ml de metanol puro,
- 5) Centrifugar por 3min a 3000 RPM. Foi utilizada a centrífuga para 16 tubos de ensaio da Quimis®,
- 6) Passar o sobrenadante para um tubo de ensaio rosqueável seco, pesado e identificado,
- 7) Acrescentar 0,8ml de clorofórmio puro,
- 8) Adicionar 0,64ml de solução de NaCl a 0,73%,
- 9) Homogeneizar em vórtex por ± 30 seg,
- 10) Centrifugar por 10 min a 3000 RPM,
- 11) Desprezar a fase superior com pipeta de Pasteur,
- 12) Lavar três vezes a parede interna do tubo de ensaio com 0,3ml de solução de Folch de cada vez sem afetar a parte superior,
- 13) Desprezar a fase superior,
- 14) Secar em estufa semi- aberta a 40°C, sugestão *overnight*, mas verificar se o solvente evaporou por completo antes de prosseguir.

As etapas envolvendo os solventes foram realizadas em capela de exaustão.

Método de Hartman & Lago (1973) modificado:

Após a etapa anterior, procede-se com a saponificação e esterificação desses ácidos graxos, com as seguintes etapas:

- 1) Pesar os tubos com a amostra da etapa anterior,
- 2) Para as etapas seguintes, utilizar uma alíquota de 15mg de amostra,
- 3) Adicionar 1,2ml de reagente de saponificação,
- 4) Rosquear os tubos de ensaio e levar ao banho-maria por ± 15 min,
- 5) Adicionar 3ml de reagente de esterificação no tubo de ensaio que saiu do banho-maria,
- 6) Rosquear os tubos de ensaio e levar novamente ao banho-maria por ± 15 min,
- 7) Deixar resfriar até 40°C,
- 8) Adicionar 0,5ml de hexano,
- 9) Adicionar 1,5ml de NaCl a 20%,
- 10) Homogeneizar em vórtex por ± 30 seg,
- 11) Retirar a fase superior e transferir para um frasco âmbar previamente identificado,
- 12) Adicionar novamente no restante do tubo de ensaio 0,5ml de hexano,
- 13) Retirar a fase superior e colocar no mesmo frasco âmbar,
- 14) Borrifar nitrogênio até evaporar todo o hexano, fechar o tubo de ensaio,
- 15) Armazenar em 20°C.

As etapas envolvendo os solventes foram realizadas em capela de exaustão.

Preparo de Soluções

✓ **Extração de lipídeos e obtenção dos ésteres dos ácidos graxos**

1. Solução de Folch

- 3% de clorofórmio,
- 48% de metanol,
- 47% de água destilada,
- 2% de NaCl 29%

Misturar os componentes. Agitar no agitador magnético por 10min e reservar em frasco âmbar.

2. Reagente de esterificação

- 2g de cloreto de amônio,
- 60mL de metanol,
- 3mL de ácido sulfúrico concentrado

Adicionar o cloreto de amônio e o metanol em balão volumétrico, próprio para refluxo. Adicionar, pelas paredes do balão e vagarosamente o ácido sulfúrico. Colocar a mistura em refluxo por três horas, até a dissolução total do cloreto de amônio.

3. Reagente de saponificação

- 2g de NaOH,
- 100ml de metanol

Adicionar o hidróxido de sódio no balão volumétrico de 100mL, completar o volume com metanol, dissolver o NaOH. Reservar em recipiente de plástico.

✓ **Solução fixadora**

4. Fixador Karnovsky

Solução A:

-Paraformaldeído 4%

100 ml de paraformaldeído 40%

900 ml de tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,3 (450ml de água destilada + 450ml de tampão fosfato 0,2M)

Solução B:

-Glutaraldeído

160ml de glutaraldeído 25%

420ml de tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,3

420ml de água destilada

Manter as duas soluções na geladeira e misturar na hora do uso.

✓ **Corantes**

5. Eosina

Eosina yellowish (Eosina y)----- 2g

Bicromato (dicromato de potássio)----- 1g

Solução aquosa saturada de ácido pícrico---- 20,0ml

Álcool absoluto----- 20,0ml

Água destilada----- 160,0ml

Dissolver a eosina no álcool (solução A) e o bicromato de potássio na água (solução B). Misturar A e B e adicionar a solução de ácido pícrico.

6. Hematoxilina de Harris

Hematoxilina ----- 0,5g

Álcool absoluto---- 5,0ml

Sulfato de alumínio e potássio (alúmen de potássio)--- 10,0g

Óxido vermelho de mercúrio ----- 0,25g

Água destilada----- 100,0ml

Dissolver a hematoxilina no álcool e o sulfato de alumínio e potássio na água quente. Misturar as duas soluções e aquecer até a fervura. Remover do fogo, adicionar o óxido de mercúrio e mergulhar o frasco (contendo a solução) em água fria. Essa solução envelhece no prazo de 2 a 3 meses, época em que se forma um precipitado no seu fundo e o corante passa a corar os tecidos fracamente. Nestas condições, preparar nova solução.

7. Azul de Toluidina- Borato de sódio

- 0,5g de azul de toluidina

-1 g de borato de sódio

-99ml de água destilada

Dissolver 1g de borato de sódio em 99ml de água destilada e, em seguida, acrescentar 0,5g de azul de toluidina. Agitar e filtrar em papel filtro. Conservar em frasco âmbar.

8. Reativo de Schiff

Fucsina básica----- 1g
Água destilada----- 200ml
Ácido clorídrico 1N----- 20ml
Bissulfito de anidro----- 1g

Ferver a água destilada e adicionar a fucsina básica. Esfriar até 50°C e filtrar. Adicionar o ácido clorídrico 1N, esfriar até 25°C e acrescentar o bissulfito de sódio. Guardar a solução em ambiente escuro durante pelo menos 12 horas (a recomendação é de 48 horas). Em seguida, adicionar 2g de carvão ativado, misturar e filtrar.

Obs: Solução HCL 1N:

HCl concentrado----- 8,5ml
Água destilada----- 91,5ml

9. Azul de Alcian pH 2,5

Água destilada-----97ml
Ácido acético glacial-----3ml
Alcian Blue 8 GX-----1g

Dissolver o Alcian Blue na água destilada e ácido acético. Agitar por 15 min no agitador magnético e filtrar em papel filtro. Conservar em frasco âmbar.

Referências

ABREU, F.B.; SILVA, D.J.H da; CRUZ, C.D.; MIZUBUTI, E.S.G. Inheritance of resistance to *Phytophthora infestans* (Peronosporales, Pythiaceae) in a new source of resistance in tomato (*Solanum* sp. (formerly *Lycopersicon* sp.), Solanales, Solanaceae) **Genetics and Molecular Biology**. 31 (2): 493-497, 2008.

AGUIAR, A.S. de. **Toxicidade do consumo crônico de baixas doses de etanol e predisposição ao alcoolismo em animais desnutridos**. Tese de doutorado, Universidade Federal Fluminense. 170p., 2008.

ALMARIO, R.U.; VONGHAVARAVAT, V.; WONG, R.; KASIM-KARAKAS, S.E. Effects of walnut consumption on plasma fatty acids and lipoprotein in combined hyperlipidemia. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 74(1):72-79, 2001.

ALVARADO-RICO, S. & CASTRO, L. Histología del Hígado de Ratas Tratadas con una Infusión de Hojas de Higuera (*Ficus carica*). Reporte de Caso. **Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias**. 51(2): 99-103, 2010.

ANJO, D.F.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**. 3(2):145-54, 2004.

AUGUSTO, R.M.N. **Maltodextrina em rações de leitões desmamados com diferentes pesos**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista. 86p., 2009.

ANTUNES, D.M.F. **Avaliação da absorção intestinal de D-xilose no modelo experimental de inflamação intestinal crônica antígeno-específica em ratos**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Fluminense. 115p., 2007.

ANTUNES, M.T. **Fornecimento de dieta úmida para frangos de corte e poedeiras comerciais**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. 72p., 2008.

AXTELL, B.L. & FAIRMAN, R.M. Food and agriculture organization of the united nations. **FAO Agricultural Services Bulletin**. 94, 1992. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/x5043e/x5043e00.htm>. Acesso em 28 de julho de 2011.

BANCROFT, J.D. & STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**. 4ª ed. Churchill Livingstone. 1996.

BATISTA, A.G.U; LOPES, R.A.; SOUZA, M.A. DE; KASAI, A.; LOPES, P.E.V. DE P.; SALA, M.A.; REGALO, S.C.H.; PETENUSCI, S.O. Hepatotxicidade de plantas medicinais. XLIX. Ação da infusão de *Cayaponia tayuya* (Vell.) Cogn. no camundongo. **Revista Científica da Universidade de Franca**. 6 (1), 2006.

BATTISTELLI, S.; CITTERIO, B.; BALDELLI, B.; PARLANI, C.; MALATESTA, M. Histochemical and morpho-metrical study of mouse intestine epithelium after a long term diet containing genetically modified soybean. **European Journal of Histochemistry**. 54 (3): 36, 2010.

BOLELI, I.C. Estrutura Funcional do trato digestório. In: MACARI, M; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (Eds). **Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte**. 3 ed. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 75-95, 2002.

BRITO, L.F. **Evolução da lesão aterosclerótica e perfil lipídico de camundongos knockout apoE alimentados com resíduo de café seco e fermentado**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 114p., 2008.

BURDGE, G.C. & WOOTOON, S.A. Conversion of α -linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. **British Journal of Nutrition**. 88 (4): 411-20, 2002.

BUSSMANN, R.W.; TELLEZ, C.; GLENN, A. *Plukenetia huayllabambana* sp. nov. (Euphorbiaceae) from the upper Amazon of Peru. **Nordic Journal of Botany**. 27: 313-315, 2009.

CAI, Z.Q. Shade delayed flowering and decreased photosynthesis, growth and yield of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) plants. **Industrial Crops and Products**. 34: 1235– 1237, 2011.

CALDERELLI, V.A.S.; BENASSI, M. de T.; MATIOLI, G. Substituição da gordura hidrogenada por óleo de soja na elaboração de pães de linhaça e avaliação da aceitabilidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 28 (3): 668-674, 2008.

CALLEJA, L.; PARÍS, M.A.; PAUL, A.; VILELLA, E.; JOVEN, J.; JIMÉNEZ, A.; BELTRÁN, G.; UCEDA, M.; MAEDA, N.; OSADA, J. Low-Cholesterol and High-Fat Diets Reduce Atherosclerotic Lesion Development in ApoE-Knockout Mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. 19:2368-2375, 1999.

CAMPBELL, M.K. & FARRELL, S.O. **Bioquímica**. Volume 1- Bioquímica Básica. Ed. Thomson, 2007.

CARLOS, J. **Estudo morfológico e morfométrico do intestino delgado de camundongos imunodeprimidos submetidos à dieta enteral contendo prebióticos e contaminada por *Klebsiella pneumoniae***. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa. 77p., 2006.

CARUSO, M. & DEMONTE, A. Histomorfometria do intestino delgado de ratos submetidos a diferentes fontes protéicas. **Alimentos e Nutrição**, 16 (2): 131-136, 2005.

CÉSPEDES, I.E.I.M. Situación y avances del cultivo de Sacha Inchi em el Perú. **Cultivo de Sacha Inchi In Dirección de Investigación Agrária**. INIA Subdirección de Recursos Genéticos y Biotecnología, Estación Experimental agrária “El Povenir”- Tarapoto. 11p, 2006.

CHAPMAN, M.J. Les lipoprotéibes et le foie. **Gastroenterology Clinical Biology**. 6: 482-499, 1982.

CIED Centro de Investigación, Educación y Desarrollo. Cultivo del Sacha Inchi. **Manual de Capacitación**. Junin, Perú, 2007.

CINTRA, D.E.C. **Perfil lipídico de ratos submetidos à dieta hipercolesterolemianta à base de linhaça (*Linum usitatissimum*), amendoim (*Arachis hypogaea*), truta (*Oncorhynchus mykiss*) ou pele de frango**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 2003.

EWIN, J. **O lado sadio das gorduras – ácidos graxos essenciais para uma vida e uma aparência saudáveis**. Trad. Ana Beatriz Rodrigues, Rio de Janeiro: Campus, 1997.

FAZIO, S.; BABAEV, V.R.; MURRAY, A.B.; HASTY, A.H.; CARTER, K.J.; GLEAVES, L.A.; ATKINSON, J.B. LINTON, M.F. Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 94:4647-4652, 1997.

FOLCH, J; LEES, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. **The Journal of Biological Chemistry**. 226: 497-509, 1957.

FOLLEGATTI ROMERO, L.A. **Extração de óleo de Sacha inchi (i L.) com dióxido de carbono supercrítico**. Dissertação de Mestrado, UNICAMP. 95p., 2007.

FONTAINE, N.; MESLIN, J.C.; LORY, S.; ANDRIEUX, C. Intestinal mucin distribution in the germ-free rat and in the heteroxenic rat harbouring a human bacterial flora: effect of inulin in the diet. **British Journal of Nutrition**. 75 (6): 881-892, 1996.

FORTI, N. & DIAMENT, J. Lipoproteínas de Alta Densidade: Aspectos Metabólicos, Clínicos, Epidemiológicos e de Intervenção Terapêutica. Atualização para os Clínicos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 87: 672-679, 2006.

FRANKEL, W.; ZHANG, W. SINGH, A.; BAIN, A.; SATCHITHANANDAM, S.; KLURFELD, D.; ROMBEAU, J. Fiber: Effect on bacterial translocation and intestinal mucin content. **World Journal of Surgery**. 19 (1): 144-148, 1995.

GALLOWAY, S.; PALLEBAGE-GAMARALLAGE, M.; TAKECHI, R.; JIAN, LE; JOHNSEN, R.S.; DHALIWAL, S.; MAMO, J. C. L. Synergistic effects of high fat

feeding and apolipoprotein E deletion on enterocytic amyloid-beta abundance. **Lipids in Health and Disease**. 7 (15), 2008.

GARCIA, R.C.; OLIVEIRA, H.C.F. Fisiologia das Lipoproteínas. In: QUINTÃO, E. (Ed.). **Colesterol e aterosclerose**. Rio de Janeiro: Qualitymark, 1-30p, 1992.

GARCÍA-MIRANDA, P.; PERAL, M.J.; ILUNDAIN, A.A. Rat small intestine Express the reelin-disabled-1 signalling pathway. **Experimental Physiology**. 95 (4):498-507, 2010.

GARÓFOLO, A. & PETRILLI, A.S. Balanço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. **Revista de Nutrição**. 19(5): 611-621, 2006.

GARTNER, L.P. & HIATT, J.L. **Texto Atlas de Histología**. 2ª ed, México, McGraw-Hill Interamericana. 2002.

GARTNER, L.P. & HIATT, J.L. **Tratado de Histologia em Cores**. 2ª ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2003.

GAZZINELLI, M.L.T.; FONSECA, S.; ALVAREZ-LEITE, J.I.; BARCELOS, M. de F.P. Efeitos da ingestão de diferentes fontes lipídicas na mucosite em camundongos submetidos à quimioterapia com ara-c. **Revista Médica de Minas Gerais**. 20 (3): 310-316, 2010.

GERMAN, J.B.; DILLARD, C.J. Saturated fats: what dietary intake? **The American Journal of Clinical Nutrition**. 80:550-559, 2004.

GILLESPIE, L. J. Pollen morphology and phylogenie of the tribe Plukenetieae (Euphorbiaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 81: 317-348, 1994.

GORDON, T.; CASTELLI, W.P.; HJORTLAND, M.C.; KANNEL, W.B.; DAWBER, T.R. High density lipoproteins as a protective factor against coronary heart disease. **American Journal of Medicine**. 62: 707-714, 1977.

GUILLÉN, M.D.; RUIZ, A.; CABO, N.; CHIRINOS, R. E PASCUAL, G. Characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) Oil by FTIR Spectroscopy and ¹H NMR. Comparison with Linseed Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 80 (8), 2003.

GUYTON, A.C. **Tratado de fisiologia médica**. Ed. Guanabara Koogan, 8ed, 837p., 1992.

HAMAKER, B.R.; VALLES, C.; GILMAN, R.; HARDMEIER, R.M.; CLARK, D.; GARCÍA, H.H.; GONZALES, A.E.; KOHLSTAD, I.; CASTRO, M. Amino Acid

and Fatty Acid Profiles of the Inca Peanut (*Plukenetia volubilis* L.). **Cereal Chemistry**. 69:461-463, 1992.

HARDIN, J. A.; CHUNG, B.; LOUGHLIN, E. V. O.; GALL, D. G. The effect of epidermal growth factor on brush border surface area and function in the distal remnant following resection in the rabbit. **Gut**. 44 (1): 26-32, 1999.

HARTMAN L. & LAGO, R.C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**. 22 (6):475-6, 1973.

HU, F.B.; STAMPFER, M.J.; MANSON, J.E.; RIMM, E.B.; COLDITZ, G.A.; ROSNER B.A. Frequent nut consumption and risk of coronary heart disease in women: prospective cohort study. **British Medical Journal**. 317 (7169):1341-1345, 1998.

HUAMÁN, J.; CHÁVEZ, K.; CASTAÑEDA, E.; CARRANZA, S.; CHÁVEZ, T.; BELTRÁN, Y.; CAFFO, C.; CADILLO, R.; CADENILLAS, J. Efecto de la *Plukenetia volubilis* Linneo (sacha inchi) en la trigliceridemia posprandial. **Anales de la Facultad de Medicina**. 69(4):263-266, 2008.

HUAMANÍ, P.L.T. & FLORES, E.B. Estrategias de comercialización del Sacha Inchi. **Revista de Investigación de la Facultad de Ciencias Administrativas**.12 (03): 37-49, 2009.

HUI, Y.H.; JOHN W. **Handbook of food products manufacturing**. Sons Publication, USA, 2007.

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary Reference Intakes (DRIs) for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Part 1. **National Academy Press**. 2002.

JOINT FAO/WHO/UNU Expert Consultation 1985.

JOLY, A. B. **Botânica – Introdução à taxonomia vegetal**. Ed Nacional, São Paulo. 3ed, 1976.

JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11^a ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2008.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**. 27:137-138, 1965.

KASHYAP, V.S.; SANTAMARINA-FOJO, S.; BROWN, D.R.; PARROTT, C.L.; APPLEBAUM-BOWDEN, D.; MEYN, S.; TALLEY, G.; PAIGEN, B.; MAEDA, N. E BREWER JR., H.B.B. Apolipoprotein E Deficiency in Mice: Gene Replacement and Prevention of Atherosclerosis Using Adenovirus Vectors. **The Journal of Clinical Investigation**. 96:1612-1620, 1995.

KRIS-ETHERTON, P.M.; PEARSON, T.A.; WAN, Y.; HARGROVE, R.L.; MORIARTY, K.; FISHELL, V. High- monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 70(6): 1009-1015, 1999.

LOPES, L.M.; SOARES, J.A.C., LOPES, I.E.L.; PINTO, L.E.S.A.; MARTINEZ, T.L.R. Metabolismo das lipoproteínas. In: MARTINEZ, T.L.R.; LOURENÇO, D.M. (Eds.) **Avaliação e conduta nos riscos trombo e aterogênico**. São Paulo: Art Plus. p. 61-69, 1996.

LORA, J. **Avaliação da toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico de Folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae)**. Dissertação de mestrado. Universidade do Extremo Sul Catarinense. 59p., 2007.

MACARI, M. Fisiologia do sistema digestório das aves (III). **Aves e Ovos**. 15 (10): 2-20, 1999.

MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. et al. **Fisiologia aplicada a frangos de corte: imunologia aplicada**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP. 231-245, 2002.

MAEDA, N.; JOHNSON, L.; KIM, S.; HAGAMAN, J.; FRIEDMAN, M.; REDDICK, R. Anatomical differences and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice with 129/SvEv and C57BL/6 genetic backgrounds. **Atherosclerosis**. 195: 75–82, 2007.

MARAGON, L.C.; SOARES, J.J.; FELICIANO, A.L.P. Florística arbórea da mata da pedreira, município de Viçosa, Minas gerais. **Revista Árvore**, 27 (2): 207-215, 2003.

MARINETTI, G.V. **Disorders os lipid metabolism**. Plenum Press, Nova York, 226p., 1990.

MARQUES, S.B.S. **Estudo histológico de intestino delgado de camundongos colonizados por cepas de escherichia coli enteropatogênicas de origem bovina**. Tese de doutorado. Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, UNESP, 2006.

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. **Revista de Nutrição**. 19(6): 761-770, 2006.

MAYER, L. Mucosal immunity. **Immunological Reviews**. 206 (5): 1, 2005.

MOREIRA, A.P.B. **Interferências de ácidos graxos ômega-3 e vitamina E na carcinogênese experimental do cólon**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 80p., 2006.

NAKASHIMA, Y.; PLUMP, A.S.; RAINES, E.W.; BRESLOW, J.L.; ROSS, R. ApoEdeficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. 14:133–40, 1994.

NGUYEN, L.B.; SHEFER, S.; SALEN, G.; TINT, G.S.; RUIZ, F.; BULLOCK, J. Mechanisms for cholesterol homeostasis in rat jejuna mucosa: effects of cholesterol, sitosterol, and lovastatin. **Journal of Lipid Research**, 42: 195- 200, 2001.

O'BYRNE, D.J.; KNAUFT, D.A.; SHIREMAN, R.B. Low fat monounsaturated rich diets containing high-oleic peanuts improve serum lipoprotein profiles. **Lipids**. 32(7):687-95, 1997.

OJOPI, E.P.; BERTONCINI, A.B.; DIAS NETO, E. Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**. 31(1): 26-33, 2004.

OLSEN, R.E. & RINGO, E. Lipid digestibility in fish: A review. **Recent Research Developments in Lipids**. 1: 199–265, 1997.

OSUGA, J.; YONEMOTO, M.; YAMADA, N.; SHIMANO, H.; YAGYU, H.; OHASHI, K.; HARADA, K.; KAMEI, T.; YAZAKI, Y. E ISHIBASHI, S. Cholesterol Lowering in Low Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice Overexpressing Apolipoprotein E. **The Journal of Clinical Investigation**. 102 (02): 386-394, 1998.

PELICANO, E.R.L. Souza, P.A.de; SOUZA, H.B.A. de; OBA, A.; NORKUS, E.A.; KODAWARA, L.M.; LIMA, T.M.A. de.. Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, 98 (547): 125-134, 2003.

PENDSE, A.A.; ARBONES-MAINER, J.M.; JOHNSON, L.A.; ALTENBURG, M.K.; MAEDA, N. Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond. **Jornal of Lipid Research**. S178- S182, 2009.

PEREIRA, A.L.F. **Efeito dos lipídios da ração sobre a qualidade, composição e estabilidade dos ovos de poedeiras comerciais**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará. 87p, 2009.

PEREIRA, C. DE S.S. **Avaliação de diferentes tecnologias na extração do Óleo do Pinhão-manso (*Jatropha curcas L.*)**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 88p., 2009.

PERINI, J.A. de L.; STEVANATO, F.B.; SARGI, S.C.; VISENTAINER, J.E.L.; DALALIO, M.M. de O.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E. de, VISENTAINER,

J.V. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**. 23 (6): 1075-1086, 2010.

PIEDRAHITA, J.A.; ZHANG, S.H.; HAGAMAN, J.R.; OLIVER, P.M.; MAEDA, N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 89:4471–4475, 1992.

PIRES, A.L.G.; SILVEIRA, T.E. da; SILVA, V.D. da. Estudo morfológico e estereológico digital da mucosa do intestino delgado de crianças eutróficas e desnutridas com diarreia persistente. **Jornal de Pediatria**. 79 (4): 329-336, 2003.

PLUMP, A.S.; SMITH, J.D.; HAYEK, T. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**. 71:343–353, 1992.

PLUSKE, J.R.; HAMPSON, D.J.; WILLIAMS, I.H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**. 51 (1): 215-236, 1997.

PRACK, M.M.; NICOSIA, M.; WILLIAMS, D.L.; GWYNNET, J. Relationship between apolipoprotein E mRNA expression and tissue cholesterol content in rat adrenal gland. **Journal of Lipid Research**. 32: 1611-1618, 1991.

PRADO, I.M. DO; GIUFRIDA, W.M.; ALVAREZ, V.H.; CABRAL, V.F.; QUISPE-CONDORI, S.; SALDAÑA, M.D.A.; CARDOZO-FILHO, L. Phase Equilibrium Measurements of Sacha Inchi Oil (*Plukenetia volubilis*) and CO₂ at High Pressures. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 88:1263–1269, 2011.

PRINS, C.L.; LEMOS, C.S.L.; FREITAS, S.P. Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. 8 (4): 92-95, 2006.

REDDICK, R.L.; ZHANG, S.H.; MAEDA, N. Atherosclerosis in mice lacking apoE. Evaluation of lesional development and progression. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. 14:141-147, 1994.

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

SHERLOCK, S. **Doenças do fígado e do sistema biliar**. 5ed. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan. 603p., 1978.

SHIRAISHI, C.S.; AZEVEDO J.F. de A.; SILVA, A.V. da; SANT'ANA, D. de M.G; ARAÚJO, E.J. de A. Análise morfométrica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no íleo de frangos infectados por *Toxoplasma gondii*. **Ciência Rural**. 39 (7): 2146-2153, 2009.

SILVA, M.A. da; PESSOTTI, B.M. de S.; ZANINI, S.F.; COLNAGO, G.L.; NUNES, L. de C.; RODRIGUES, M.R.A.; FERREIRA, L. Óleo de aroeira-vermelha sobre o desempenho e a morfometria intestinal de frangos de corte. **Ciência Rural**. 40 (10), 2010.

SOARES, M.B.P.; CARVALHO, L.C.P. de; SANTOS, R.R. dos. Banco de Embriões de Camundongos Geneticamente Modificados: Uma estratégia para a preservação da diversidade genética em modelos experimentais murinos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. 20, 2001.

SOUZA, N.E. & VISENTAINER, J.V. **Colesterol da mesa ao corpo**. Varela, São Paulo. 85p., 2006.

STOUT, M.B; LIU, L.; BELURY, M.A. Hepatic steatosis by dietary-conjugated linoleic acid is accompanied by accumulation of diacylglycerol and increased membrane-associated protein kinase C α in mice. **Molecular Nutrition & Food Research**. 55: 1010–1017, 2011.

TACONIC. Smart Solutions to Improve Human Health. **Apoe targeted mutation mice**. 3, 2008. Disponível em: <http://www.taconic.com>. Acesso em 04 de julho de 2011.

THOMPSON, G.R. **A handbook of hyperlipidaemia**. Current Science, Londres. 235p., 1989.

THOMSON, A.B.R., SCHOELLER, C., KEELAN, M., SMITH, L. & CLANDININ, M.T. Lipid absorption: passing through the unstirred layers, brush-border membrane, and beyond. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. 71: 531–555, 1993.

THOMSON, A.B.R.; KEELAN, M.; THIESEN, A.; CLANDININ, M.T.; ROPELESKI, M.; WILD, G.E. Small Bowel Review Normal Physiology Part 1. **Digestive Diseases and Sciences**. 46 (12): 2567–2587, 2001.

TSO, P. & FUJIMOTO, K. The absorption and transport of lipids by the small intestine. **Brain Research Bulletin**. 27: 477–482, 1991.

TSUKUI, T.; BABA, N.; HOSOKAWA, M.; SASHIMA, T.; MIYASHITA, K. Enhancement of hepatic docosahexaenoic acid and arachidonic acid contents in C57BL/6J mice by dietary fucoxanthin. **Fisheries Science**. 75:261–263, 2009.

TUCCI, F.M. **Efeitos da adição de agentes tróficos na dieta de leitões desmamados sobre a renovação celular da mucosa intestinal, enzimas digestivas e desempenho.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, 84 p. 2003.

UNI, Z. Vitamin A deficiency interferes with proliferation and maturation of cells in the chickens in small intestine. **British Poultry Science.** 41 (2): 410-415, 2000.

VALENTE, S.T.X. **Efeito de corantes naturais nos níveis de colesterol e triacilgliceróis séricos em ratos hiperlipidêmicos.** Tese de doutorado. Universidade federal de Viçosa, 126p, 1998.

VIDAL, T.F. **Qualidade, composição e estabilidade dos ovos de poedeiras alimentadas com farelo da castanha de caju.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará. 65p., 2009.

VIJAIMOHAN, K.J.M.; SABITHA, K.E.; SUBRAMANIYAM, S.; ANANDHAN, C.; SHYAMALA, D. Beneficial effects of alpha linolenic acid rich flaxseed oil on growth performance and hepatic cholesterol metabolism in high fat diet fed rats. **Life Sciences.** 79(5): 448-454, 2006.

WANG, H.; HUNG, T.; WEI, J.; CHIANG, A. Fish oil increases antioxidant enzyme activities in macrophages and reduces atherosclerotic lesions in apoE-knockout mice. **Cardiovascular Research.** 61: 169- 176, 2004.

WOUTERS, K.; VAN GORP, P.J.; BIEGHS, V.; GIJBELS, M.J.; DUIMEL, H.; L' UTJOHANN, D.; KERKSIEK, A.; VAN KRUCHTEN, R.; MAEDA, N.; STAELS, B.; VAN BILSEN, M.; SHIRI-SVERDLOV, R.; HOFKER, M.H. Dietary Cholesterol, Rather than Liver Steatosis, Leads to Hepatic Inflammation in Hyperlipidemic Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis. **Hepatology.** 48 (2), 2008.

YASAR, S. & FORBES, J.M. Effects of wetting and enzyme supplementation of wheat- based foods on performance and gut responses of broiler chickens. **British Poultry Science.** 38: S43-S44, 1998.

YUNES, J.F.F. **Avaliação dos efeitos da adição de óleos vegetais como substitutos de gordura animal em mortadela.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Maria. 103p., 2010.

ZADELAAR, S.; KLEEMANN, R.; VERSCHUREN, L.; VRIES-VAN DER WEIJ, J. DE; VAN DER HOORN, J.; PRINCEN, H.M.; KOOISTRA, T. Mouse Models for Atherosclerosis and Pharmaceutical Modifiers. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.** 27:1706-1721, 2007.

ZAMBÓN, D.; SABATÉ, J.; MUÑOZ, S.; CAMPERO, B.; CASALS, E.; MERLOS, M. Substituting walnuts for monounsaturated fat improves the serum lipid profile of hypercholesterolemic men and women: a randomized crossover trial. **Annals of Internal Medicine**. 132(7): 538-46, 2000.

ZHANG, S.H.; REDDICK, R.L.; PIEDRAHITA, J.A.; MAEDA, N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. **Science**. 258:468–471, 1992.

ZHANG, L.; GENG, Y.; YIN, M.; MAO, L.; ZHANG, S.; PAN, J. Low u-6/u-3 polyunsaturated fatty acid ratios reduce hepatic C-reactive protein expression in apolipoprotein E–null mice. **Nutrition**. 26: 829–834, 2010.