

**EDUARDO FRANÇA CASTRO**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO DO  
ÓLEO DA SEMENTE DE *Plukenetia volubilis* E SEU EFEITO NA  
COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DO FÍGADO E TECIDO ADIPOSEO E NA  
HISTOPATOLOGIA DO TRONCO AÓRTICO DE CAMUNDONGOS  
C57BL/6 E apoE<sup>-/-</sup>**

Tese 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  
*Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

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

T

C355o  
2013  
Castro, Eduardo França, 1974-  
Obtenção e caracterização do perfil lipídico do óleo da semente de *Plukenetia volubilis* e seu efeito na composição lipídica do fígado e tecido adiposo e na histopatologia do tronco aórtico de camundongos C57BL/6 e apoE<sup>-/-</sup> / Eduardo França Castro – Viçosa, MG, 2013.  
xv, 123f. : il. (algumas color) ; 29cm.

Inclui apêndices.

Orientadora: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Aterosclerose. 2. *Plukenetia volubilis*. 3. Óleos vegetais.  
4. Ácidos graxos Ômega-3. 5. Histopatologia.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 616.136

**EDUARDO FRANÇA CASTRO**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO DO  
ÓLEO DA SEMENTE DE *Plukenetia volubilis* E SEU EFEITO NA  
COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DO FÍGADO E TECIDO ADIPOSEO E NA  
HISTOPATOLOGIA DO TRONCO AÓRTICO DE CAMUNDONGOS  
C57BL/6 E apoE<sup>-/-</sup>**

Tese 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  
*Doctor Scientiae*.

**APROVADA: 26 de fevereiro de 2013.**

---

**Helen Hermana Miranda  
Hermsdorff**

---

**José Emílio Zanzirolani de  
Oliveira**

---

**Maria do Carmo G. Peluzio**

---

**Juliana Silva Rocha**

---

**Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado  
(Orientadora)**

*“Somos todos visitantes deste tempo, deste lugar.*

*Estamos só de passagem.*

*O nosso objetivo é observar, crescer, amar...  
e depois vamos para casa.” - Provérbio aborígene -*

*"Historicamente, as coisas mais  
terríveis - guerra, genocídio, e  
escravidão - resultaram não da  
desobediência, mas sim da  
obediência." - Howard Zinn -*

*“Nada fortalece tanto o  
autoritarismo quanto o  
silêncio.” - Leonardo da Vinci -*

*“Meu Pai deu-me este corpo que é efêmero,  
mas meu Mestre, deu-me uma vida  
que é imortal.” - Alexandre, O Grande -*

*Dedico esta tese aos meus pais Jane França Castro (in memoriam) e José dos Santos Siqueira Castro (in memoriam), à minha irmã e aos meus familiares.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais, José dos Santos Siqueira Castro (*in memorian*) e Jane França Castro (*in memorian*), à minha irmã, Valéria França Castro Barbosa e a minha Família pelos exemplos de Vida, conselhos, ensinamentos, compreensão, apoio e Amor incondicional, ontem, hoje e sempre.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e aos Departamentos de Biologia Geral (DBG), Engenharia Florestal (DEF), Nutrição e Saúde (DNS) da UFV pela excelência em Ensino, Pesquisa e Extensão.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado (DBG/UFV) e coorientadora Prof<sup>a</sup>. Maria do Carmo Gouveia Peluzio (DNS/UFV) pelo profissionalismo, ensinamentos, orientações e confiança.

Ao Prof<sup>o</sup>. Eduardo Euclides de Lima e Borges (DEF/UFV), ao técnico José Mauro Ferreira (DEF/UFV) e à Prof<sup>a</sup>. Ana Vlândia Bandeira Moreira (DNS/UFV) pela disponibilidade, colaboração e ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural do DBG/UFV e do Laboratório de Bioquímica Nutricional (DNS/UFV), presentes e solidários em todas as etapas de realização deste trabalho.

À Bruna Fontana Thomazini pela ajuda no desenvolvimento da parte experimental deste trabalho.

À Zezé, Pâmela, Juninho e agregados da Família da Zezé em Viçosa pela amizade e companhia.

Aos amigos de Leopoldina que sempre estiveram presentes em todas as etapas de minha vida: Marco Aurélio, Juliana, Leo Seoldo, Cid, Dean, Raquel, Marcinha, Fernanda, Lalá, Carlinhos e muitos outros... minha eterna gratidão pela amizade e compreensão.

Aos amigos de Ubá e da UFV *Campus* Florestal.

Às Pessoas Especiais que fizeram e fazem parte de minha vida.

Às minhas orientandas do PIBID Ciências Biológicas da UFV *Campus* Florestal e alunos das disciplinas ministradas na UFV *Campus* Florestal pelo apoio e compreensão.

A todos que colaboraram, direta ou indiretamente, no decorrer do curso e desenvolvimento e concretização deste trabalho.

## BIOGRAFIA

Eduardo França Castro, filho de José dos Santos Siqueira Castro (*in memorian*) e Jane França Castro (*in memorian*), nascido em 26 de agosto de 1974 em Leopoldina, Estado de Minas Gerais. Em fevereiro de 1994 ingressou no curso de graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, obtendo os títulos de *Bacharel* e *Licenciado* em março de 1999. Entre 1999 e 2002 fez o Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na linha de pesquisa: Morfofisiologia de Animais Domésticos e Selvagens. De 2002 a 2007 trabalhou na área administrativa no município de Ubá, MG. De 2007 a 2009 foi professor da rede Estadual de Ensino de Minas Gerais, ministrando aulas no Ensino Fundamental, Médio e Superior. Neste mesmo período foi professor e coordenador do curso Técnico em Meio Ambiente da Rede Sagrado Coração de Maria no município de Ubá, MG. Em 2009 ingressou no curso de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural, do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na linha de pesquisa: Biologia das Células e dos Tecidos. No dia 06 de março de 2009 foi aprovado em concurso público para compor o quadro efetivo de docentes da Universidade Federal de Viçosa, UFV *Campus* Florestal, onde atua em atividades de ensino, pesquisa, extensão e administração.

# SUMÁRIO

|   |             |
|---|-------------|
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>   | <b>viii</b> |
| <b>LISTA DE TABELAS .....</b>   | <b>x</b>    |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....</b>   | <b>xii</b>  |
| <b>RESUMO .....</b>   | <b>xiii</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>   | <b>xv</b>   |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>01</b>   |
| <b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>   | <b>03</b>   |
| 2.1. ATEROSCLEROSE .....  | 03          |
| 2.2. GÊNESE E FISIOPATOLOGIA DA ATEROSCLEROSE .....   | 08          |
| 2.3. MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDO DA ATEROSCLEROSE ..  | 16          |
| 2.4. <i>Plukenetia volubilis</i> .....  | 20          |
| 2.4. REFERÊNCIAS .....  | 26          |
| <b>3. OBJETIVOS .....</b>   | <b>32</b>   |
| <b>4. ARTIGO I: Extração e caracterização do perfil lipídico do óleo das sementes de sachá kiruma (<i>Plukenetia volubilis</i> L.) cultivada em Viçosa – MG .....</b> | <b>33</b>   |
| RESUMO .....  | 33          |
| ABSTRACT .....  | 34          |
| 4.1. INTRODUÇÃO .....   | 35          |
| 4.2. MATERIAL E MÉTODOS .....   | 39          |
| 4.3. RESULTADOS .....   | 43          |
| 4.4. DISCUSSÃO .....  | 45          |
| 4.5. CONCLUSÃO .....  | 47          |
| 4.6. REFERÊNCIAS .....  | 48          |

|   |            |
|---|------------|
| <b>5. ARTIGO II: Efeito da dieta enriquecida com óleo de <i>Plukenetia volubilis</i> na composição lipídica do fígado e tecido adiposo e na histopatologia do tronco aórtico de camundongos da linhagem C57BL/6 .....</b> | <b>51</b>  |
| RESUMO .....  | 51         |
| ABSTRACT .....  | 53         |
| 5.1. INTRODUÇÃO .....   | 54         |
| 5.2. MATERIAL E MÉTODOS .....   | 56         |
| 5.3. RESULTADOS .....   | 62         |
| 5.4. DISCUSSÃO .....  | 67         |
| 5.5. CONCLUSÃO .....  | 70         |
| 5.6. REFERÊNCIAS .....  | 71         |
| <br>  |            |
| <b>6. ARTIGO III: Influência da dieta enriquecida com óleo de sachakiruma (<i>Plukenetia volubilis</i>) na aterosclerose .....</b>  | <b>74</b>  |
| RESUMO .....  | 74         |
| ABSTRACT .....  | 75         |
| 6.1. INTRODUÇÃO .....   | 76         |
| 6.2. MÉTODOS .....  | 78         |
| 6.3. RESULTADOS .....   | 85         |
| 6.4. DISCUSSÃO .....  | 92         |
| 6.5. CONCLUSÃO .....  | 97         |
| 6.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 98         |
| <br>  |            |
| <b>7. CONCLUSÃO GERAL .....</b>   | <b>102</b> |
| <br>  |            |
| <b>APÊNDICES .....</b>  | <b>104</b> |

## LISTA DE FIGURAS

- |   | Pág. |
|---|------|
| <b>Figura 1:</b> <i>Plukenetia stipellata</i> e <i>Plukenetia volubilis</i> . <b>A)</b> Hábito de <i>Plukenetia</i> : trepadeira; <b>B)</b> Lado adaxial da base da folha de <i>P. stipellata</i> , mostrando par de estipelas entre o par de glândulas basilaminares. <i>P. volubilis</i> não possui par de estipelas, embora apresente glândula basilaminar única. <b>C)</b> Pistilo da flor; <b>D)</b> Flor estaminada de <i>P. stipellata</i> com cinco sépalas e 25 a 40 estames; <b>E)</b> Flor estaminada de <i>P. volubilis</i> com 16 a 30 estames robustos e cônicos de 0,4 a 0,5 mm de comprimento e 4 sépalas; <b>F)</b> Cápsula seca do fruto tetralocado; <b>G)</b> Semente em vista ventral; <b>H)</b> Semente em vista lateral. Adaptado de Gillespie (1993). <b>I)</b> e <b>J)</b> Fotografias da <i>P. volubilis</i> cultivada em Viçosa, MG. | 22   |
| <b>Figura 2:</b> <i>Plukenetia volubilis</i> . <b>A)</b> Detalhe da parte aérea da planta; <b>B)</b> Cápsula seca do fruto tetralocado. <b>C)</b> Semente em vista superior; <b>D)</b> Fruto do tipo cápsula em forma de estrela, não maduro.   | 36   |
| <b>Figura 3:</b> Etapas do processo de extração do óleo das sementes de <i>Plukenetia volubilis</i> . (A) Sementes desumidificadas; (B) Sementes após a moagem; (C) Etapa de extração contendo seis Soxhlet's sob a placa aquecedora, acoplados ao condensador; (D) Processo de destilação com evaporador rotativo, contendo óleo (cor amarelo-ouro) no balão em Banho-Maria e hexano purificado (seta). ( <b>Apêndice I</b> ).   | 41   |
| <b>Figura 4:</b> Linha do tempo do experimento. Camundongos <i>Mus musculus</i> da linhagem C57BL/6 (Black). Idade em dias dos animais.   | 57   |
| <b>Figura 5:</b> Fotomicrografias da porção proximal da aorta de camundongos Black tratados com óleo de <i>Plukenetia volubilis</i> ( <b>A</b> ) ou soja ( <b>B</b> ). Aumento de 40x. Colorações de Tricrômico de Masson ( <b>A</b> ) e Verhoeff ( <b>B</b> ). Barra = 50 micrômetros.   | 66   |
| <b>Figura 6:</b> Linha do tempo do experimento. Camundongos <i>Mus musculus</i> da <i>knock out</i> para o gene da apoE <sup>-/-</sup> . Idade em dias dos animais.   | 79   |
| <b>Figura 7:</b> Fotomicrografias da porção proximal ( <b>A</b> ) e ascendente ( <b>B</b> ) do tronco aórtico de camundongos apoE <sup>-/-</sup> . A estrela indica as valvulas aórticas. Colorações: Verhoeff ( <b>A</b> ) e Tricromio de Masson ( <b>B</b> ), respectivamente. Aumento: 40x. Barra = 50 micrômetros.  | 88   |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 8:</b> Fotomicrografias de diferentes tipos histopatológicos de lesões presentes na aorta de camundongos apoE <sup>-/-</sup> : <b>A e B</b> –Lesões histopatológicas do tipo II; <b>C e D</b> –Lesões histopatológicas do tipo III e IV, respectivamente; <b>E e F</b> –Lesões histopatológicas do tipo V e VI, respectivamente. Colorações: <b>A, C, D e E</b> –Tricromo de Masson; <b>B e F</b> –Verhoeff. <b>CC</b> –Cristais de Colesterol; <b>FA</b> –Fibroateroma; <b>FAR</b> –Fibroateroma com ruptura de superfície; <b>L</b> –luz da aorta; <b>Ls</b> –lesão aterosclerótica; <b>NL</b> –Núcleo Lipídico(Ateroma); <b>Tnl</b> –Túnica Íntima; <b>TnM</b> –Túnica Média; <b>V</b> –Válvula aórtica. Barra = 50 micrômetros. | 91  |
| <b>Figura 9:</b> Sementes de <i>Plukenetia volubilis</i> .  | 104 |
| <b>Figura 10:</b> Estufa de desumidificação Laboratório de Micorrizas do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa.  | 104 |
| <b>Figura 11:</b> <b>(A)</b> Moinho de Rotor Vertical com facas móveis (estrelas), acopladas a um eixo ligado diretamente ao motor do equipamento, e facas fixas; <b>(B)</b> Alimentação do moinho para o processo de moagem.   | 105 |
| <b>Figura 12:</b> Sementes após processo de moagem.   | 105 |
| <b>Figura 13:</b> Balão de fundo chato acoplado ao Soxhlet's com cartucho antes de iniciar o processo de extração.  | 106 |
| <b>Figura 14:</b> Etapa de extração contendo seis Soxhlet's sob a placa aquecedora, acoplados ao condensador.   | 107 |
| <b>Figura 15:</b> Solução contendo hexano e óleo, de cor amarelada, obtida após o processo de extração.   | 107 |
| <b>Figura 16:</b> Processo de filtração a vácuo da mistura obtida após extração.  | 108 |
| <b>Figura 17:</b> Evaporador rotativo iniciando o processo de destilação da mistura (coloração amarela – balão em Banho-Maria).   | 108 |
| <b>Figura 18:</b> Evaporador rotativo finalizando o processo de destilação, contendo óleo no balão em Banho-Maria e hexano purificado (seta).   | 109 |
| <b>Figura 19:</b> Processo final na obtenção do óleo, por meio da injeção de nitrogênio no óleo.  | 110 |
| <b>Figura 20:</b> Espectrofotômetro UV/VIS do Laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição da UFV.   | 114 |
| <b>Figura 21:</b> Cromatógrafo gasoso do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição da UFV.   | 116 |

# LISTA DE TABELAS

|   | Pág. |
|---|------|
| <b>Tabela 1:</b> Composição química das sementes de <i>Plukenetia volubilis</i> L. e propriedades físico-químicas do óleo bruto. Adaptado de Gutiérrez et al. (2011)  | 23   |
| <b>Tabela 2:</b> Composição dos principais ácidos graxos de óleos extraídos de diferentes espécies. Valores médios (%)  | 25   |
| <b>Tabela 3:</b> Resultados da eficiência das Etapas de extração do óleo de sachá kiruma  | 43   |
| <b>Tabela 4:</b> Concentração de ácidos graxos do óleo de sementes de <i>Plukenetia volubilis</i> cultivadas em Viçosa, MG, mediante extração por hexano  | 44   |
| <b>Tabela 5:</b> Caracterização dos grupos experimentais  | 56   |
| <b>Tabela 6:</b> Concentração de ácidos graxos dos óleos das sementes de <i>Plukenetia volubilis</i> e de soja utilizados nas dietas de camundongos Black   | 62   |
| <b>Tabela 7:</b> Parâmetros de consumo alimentar, massa corporal e do fígado (em grama) de camundongos Black alimentados com ração enriquecida com óleo de <i>Plukenetia volubilis</i> ou óleo de soja                        | 63   |
| <b>Tabela 8:</b> Perfil dos principais ácidos graxos presentes na gordura abdominal e no fígado de camundongos Black alimentados com dieta enriquecida com óleo de <i>P. volubilis</i> ou de soja                             | 65   |
| <b>Tabela 9:</b> Análises das características morfométricas da aorta proximal de camundongos Black alimentados com dieta enriquecida com óleo de sementes de <i>Plukenetia volubilis</i> ou de soja                           | 66   |
| <b>Tabela 10:</b> Caracterização dos grupos experimentais   | 78   |
| <b>Tabela 11:</b> Tabela utilizada para as análises de classificação quanto à patogênese e ao tipo de lesão aterosclerótica presente nas secções da aorta dos animais do experimento. Adaptação de Stary (2000) <sup>22</sup> | 83   |
| <b>Tabela 12:</b> Concentração de ácidos graxos dos óleos das sementes de <i>P. volubilis</i> e de soja utilizados nas dietas de camundongos apoE <sup>-/-</sup>  | 85   |

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 13:</b> Parâmetros de consumo alimentar, massa corporal e massa do fígado de camundongos apoE <sup>-/-</sup> , alimentados com ração enriquecida com óleo de <i>P. volubilis</i> ou de soja      | 86 |
| <b>Tabela 14:</b> Perfil de ácidos graxos na gordura abdominal e no fígado de camundongos apoE <sup>-/-</sup> alimentados com dieta enriquecida com óleo de <i>P. volubilis</i> ou de soja                 | 87 |
| <b>Tabela 15:</b> Morfometria das regiões proximal e ascendente da aorta de camundongos apoE <sup>-/-</sup> alimentados com dieta enriquecida com óleo de <i>P. volubilis</i> e de soja                    | 88 |
| <b>Tabela 16:</b> Frequência (%) das lesões nas porções proximal e ascendente da aorta, de acordo com sua patogênese e tipos histopatológicos, por grupo tratado, independente do sexo dos animais. p>0,05 | 90 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

|                  |   |   |
|------------------|---|---|
| AGE              | = | ácidos graxos essenciais                |
| apoE             | = | apolipoproteína E                       |
| CE               | = | células endoteliais                     |
| cm               | = | centímetro                              |
| CML              | = | células musculares lisas                |
| dL               | = | decilitro                               |
| DP               | = | desvio padrão                           |
| ERO <sub>2</sub> | = | espécies reativas de oxigênio           |
| g                | = | grama                                   |
| HDL              | = | lipoproteína de alta densidade          |
| IL               | = | interleucina                            |
| kg               | = | quilograma                              |
| LDL              | = | lipoproteína de baixa densidade         |
| LDLox            | = | lipoproteína de baixa densidade oxidada |
| mg               | = | miligrama                               |
| MG               | = | Minas Gerais                            |
| mm               | = | milímetro                               |
| MUFA             | = | ácidos graxos monoinsaturados           |
| NO               | = | óxido nítrico                           |
| $p$              | = | probabilidade                           |
| PCR              | = | proteína C reativa                      |
| PUFA             | = | ácidos graxos poliinsaturados           |
| UFV              | = | Universidade Federal de Viçosa          |
| $\Sigma$         | = | somatório                               |
| $\omega$ 3       | = | ácidos graxos da série ômega-3          |
| $\omega$ 6       | = | ácidos graxos da série ômega-6          |
| $\omega$ 9       | = | ácidos graxos da série ômega-9          |
| $\mu$ m          | = | micrômetro                              |

## RESUMO

CASTRO, Eduardo França, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Obtenção e caracterização do perfil lipídico do óleo da semente de *Plukenetia volubilis* e seu efeito na composição lipídica do fígado e tecido adiposo e na histopatologia do tronco aórtico de camundongos C57BL/6 e apoE<sup>-/-</sup>**. Orientadora: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado.

A aterosclerose é uma doença de natureza inflamatória e caracterizada pela formação de lesões nas artérias de grande e médio calibre. Atualmente, procura-se identificar medidas preventivas que possam diminuir a prevalência da aterosclerose, e dentre elas, está o consumo de ácidos graxos poliinsaturados, principalmente da família  $\omega 3$  por suas propriedades antiinflamatórias. Nesse sentido, o óleo de sacha kiruma (*Plukenetia volubilis*) se destaca pelo elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados (84,67%), dos quais, pelo menos 48,42% pertencem à família  $\omega 3$ . O presente trabalho teve como objetivos: (i) caracterizar o perfil lipídico das sementes de *P. volubilis* cultivadas no município de Viçosa, MG; (ii) avaliar os efeitos da dieta enriquecida com óleo de sementes de sacha kiruma em camundongos das linhagens C57BL/6 e apoE<sup>-/-</sup>. O óleo, após extração com hexano, teve o seu perfil lipídico analisado através de cromatografia gasosa. Utilizou-se este óleo para produção de dietas normolipídicas (7%/AIN-93G), que foram ofertadas por 90 dias a camundongos Black (n=10) e apoE<sup>-/-</sup> (n=10) e para controle foi utilizado dieta enriquecida com óleo de soja, para camundongos Black (n=10) e apoE<sup>-/-</sup> (n=10). Avaliou-se o consumo alimentar, a massa corporal, o metabolismo lipídico e características morfológicas e histopatológicas da aorta. Foram obtidos os seguintes resultados: (i) a análise do perfil lipídico revelou 6,29% de ácidos graxos saturados e elevado teor de poliinsaturados (86,49%), destes 51,18% são de  $\omega 3$  e 35,31% de  $\omega 6$ ; (ii) o tratamento com óleo de sacha kiruma influenciou na maior deposição dos ácidos graxos essenciais (poliinsaturados  $\omega 3$  e  $\omega 6$ ) e menor relação entre  $\omega 3/\omega 6$  no fígado e gordura abdominal de camundongos Black e apoE<sup>-/-</sup>, o que pode ter contribuído para o efeito protetor do óleo de sacha kiruma tanto na presença de menor número de lesões ateroscleróticas quanto na ausência de lesões avançadas e terminais na

aorta ascendente de camundongos  $\text{apoE}^{-/-}$ . Contudo, há necessidade de mais estudos envolvendo dieta enriquecida com óleo de sacha kiruma na aterosclerose, assim como pesquisas que visem selecionar genótipos mais produtivos e a identificação de técnicas de manejo que potencializem a quantidade e qualidade de ácidos graxos poliinsaturados em suas sementes.

## ABSTRACT

CASTRO, Eduardo França, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013. **Obtainment and characterization of the lipid profile of the seed oil *Plukenetia volubilis* and its effect on the lipid composition of the liver and adipose tissue and histopathology of the aortic trunk of C57BL/6 and apoE<sup>-/-</sup>.** Advisor: Izabel Costa Regina dos Santos Maldonado.

Atherosclerosis is a disease characterized by inflammatory nature and formation of lesions in arteries of large and medium caliber. Currently, we seek to identify preventive measures that can reduce the prevalence of atherosclerosis, and among them is the consumption of polyunsaturated fatty acids, mainly family  $\omega 3$  for its anti-inflammatory properties. In this sense, the oil sacha kiruma (*Plukenetia volubilis*) stands out for the high content of polyunsaturated fatty acids (84.67%), of which at least 48.42% belong to the family  $\omega 3$ . This study aimed to: (i) to characterize the lipid profile of the seeds of *P. volubilis* grown in Viçosa, MG, (ii) evaluate the effects of diet enriched with seed oil *P. voubilis* in mice of strains C57BL / 6 and apoE<sup>-/-</sup>. The oil, after extraction with hexane, had its lipid profile analyzed by gas chromatography. This oil was used to produce diets normolipídicas (7% / AIN-93G) that were offered for 90 days Black mice (n = 10) and apoE<sup>-/-</sup> (n = 10) and was used for control diet enriched with soybean oil to Black mice (n = 10) and apoE<sup>-/-</sup> (n = 10). We evaluated food intake, body weight, lipid metabolism and morphological and histological aorta. We obtained the following results: (i) the lipid profile analysis revealed 6.29% of saturated fatty acids and a high content of polyunsaturated (86.49%), 51.18% of these are of  $\omega 3$  and  $\omega 6$  35.31% of (ii) treatment with oil sacha kiruma influenced the greater deposition of essential fatty acids (polyunsaturated  $\omega 3$  and  $\omega 6$ ) and lower  $\omega 3/\omega 6$  relationship between abdominal fat and liver of mice and Black apoE<sup>-/-</sup>, which may have contributed to the protective effect of oil sacha kiruma both in the presence of fewer atherosclerotic lesions and absence of advanced lesions in the ascending aorta and terminals mouse apoE<sup>-/-</sup>. However, there is need for further studies involving diet enriched with oil sacha kiruma in atherosclerosis, as well as research aimed at selecting higher yielding genotypes and identify management techniques that enhance the quality and quantity of polyunsaturated fatty acids in their seeds.

# 1. INTRODUÇÃO

Uma das preocupações atuais em saúde pública é a elevada mortalidade causada por doenças cardiovasculares. Dentre elas está a aterosclerose, uma doença de natureza inflamatória, que envolve a formação progressiva de ateromas, constituída de lesões na túnica íntima de artérias de grande e médio calibre, e caracterizada pelo acúmulo de lipídios, células inflamatórias, matriz extracelular e células musculares lisas (SILVA et al., 2004; YOSHIDA, 2004; TABAS, 2008; PESEK et al., 2012).

Diversos fatores podem favorecer a aterogênese ou a formação dos ateromas, dentre eles, o histórico familiar de enfermidades metabólicas como diabetes e dislipidemias, sedentarismo, dieta hiperlipídica e elevado consumo de carboidratos (SILVA et al., 2004). Dentre as medidas preventivas para a aterosclerose estão o consumo de dieta com baixo teor de gordura saturada e colesterol e prática de atividade física regular (McGUINNESS et al., 2010). Também se recomenda o consumo de alimentos ricos em antioxidantes e ácidos graxos essenciais (AGE), dentre eles, pescado, linhaça, castanha, nozes e azeite de oliva (SBC, 2007).

No grupo dos AGE ou ácidos graxos poliinsaturados, os ácidos ômega 3 ( $\omega$ 3) têm sido objeto de pesquisa, pois estão relacionados, no organismo humano à produção de eicosanóides, substâncias que podem inibir a síntese de mediadores inflamatórios derivados do ácido araquidônico. Estudos têm evidenciado que a concentração de AGE no plasma é modulada pela ingestão dietética influenciando diretamente nas propriedades de regulação exercidas pelos AGE, como a síntese de eicosanóides, liberação de citocinas e funções de

receptores de membrana, particularmente no recrutamento de leucócitos (HAGVE et al. 1998; WALLACE et al., 2003).

Dentro desse contexto, outra fonte alternativa de ácidos graxos essenciais é o óleo extraído das sementes de sacha kiruma (*Plukenetia volubilis* L.), uma espécie nativa da Floresta Amazônica e ainda pouco conhecida em nosso meio. Hamaker et al. (1992), num trabalho pioneiro, demonstraram que o óleo de sacha kiruma tem 92,8% de ácidos graxos insaturados, destes 84,67% são poliinsaturados dos quais, pelo menos 48,42% pertencem à família  $\omega$ 3 . Por outra parte, o camundongo *knockout* para o gene da apolipoproteína-E (apoE<sup>-/-</sup>) é um dos modelos mais utilizados em pesquisa para o estudo do desenvolvimento espontâneo de lesões ateroscleróticas (ZADELAAR et al., 2007).

Diante do exposto, considerando a importância da família de ácidos  $\omega$ 3 na modulação da resposta inflamatória e do sistema imune, realizou-se este trabalho com os seguintes objetivos: a) obter e caracterizar o perfil de ácidos graxos do óleo de sacha kiruma cultivadas em Viçosa, MG; b) determinar os efeitos da dieta enriquecida com este óleo no perfil lipídico do fígado e da gordura abdominal e avaliar o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas no tronco aórtico de camundongos da linhagem C57BL/6 normal (*Black*) e da linhagem apoE<sup>-/-</sup>.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. ATEROSCLEROSE

O termo aterosclerose deriva de dois radicais gregos (*atheros* = pasta, e *sclerosis* = dureza) e designa uma enfermidade caracterizada pela presença de lesões espessas e endurecidas na camada subendotelial de artérias (FUSTER, 2009) denominadas placas ateroscleróticas, ateromas, placas fibrosas ou lesões fibrogordurosas (RUBIN, 2006).

A identificação de lesões calcificadas na parede de artérias de múmias egípcias, datadas de 1550 anos a.C., demonstrou que a aterosclerose é uma doença que já acometia o homem na antiguidade (ALLAM et al., 2011). A histologia das lesões ateroscleróticas foi descrita por Virchow em 1858, enquanto Edward Jenner, em 1786, propôs que a aterosclerose coronariana constituía a causa da angina peitoral, uma forma de cardiopatia isquêmica que é acompanhada por dor torácica (THEROUX, 2011).

A aterosclerose é uma doença progressiva, imunoinflamatória e fibroproliferativa que afeta indivíduos adultos e idosos, apresentando variações entre indivíduos, quanto a sua intensidade e gravidade (FUSTER, 2009). Com a formação de ateromas, podem ocorrer as seguintes complicações: estreitamento do vaso sanguíneo acometido e isquemia; obstrução súbita do vaso por placa hemorrágica ou ruptura; trombose e formação de êmbolos da lesão endotelial e formação de aneurisma devido ao enfraquecimento da parede vascular.

Entretanto, as manifestações clínicas da aterosclerose dependem dos vasos envolvidos e da extensão da obstrução, assim como do órgão ou tecido

afetado (GHOSH, 2012). Frequentemente, as artérias mais comprometidas são as artérias nutridoras do coração, cérebro, rins, extremidades inferiores e intestino delgado, ocasionando a doença arterial coronariana (DAC), doença arterial periférica (DAP) e doença vascular cerebral (DVC) (FUSTER, 2009; PESEK et al., 2012). Além disso, a aterosclerose é um dos principais fatores etiológicos da angina estável. Contudo, existem pacientes assintomáticos que, na autópsia, apresentavam placas ateroscleróticas (PESEK et al., 2012).

A prevalência e a gravidade da aterosclerose entre indivíduos estão relacionadas a muitos fatores de risco, modificáveis ou não. O aumento da idade e o histórico familiar são exemplos de riscos não modificáveis. A inatividade física, deficiência de estrogênio pós-menopausa, alta ingestão de carboidratos e de gorduras trans insaturadas são exemplos de fatores adquiridos relacionados ao comportamento e potencialmente controláveis (SBC, 2005; FUSTER, 2009; PESEK et al., 2012).

### **2.1.1. Principais Fatores de Risco para Aterosclerose**

#### **I – Dislipidemias**

Dislipidemias, também chamadas de hiperlipidemias, referem-se ao aumento dos lipídios (gordura) no sangue, principalmente do colesterol e dos triglicerídeos. Podem ser classificadas em **primárias** (origem genética) ou **secundárias** (causadas por doenças como hipotireoidismo, hepáticas e renais associados a *Diabetes mellitus*) ou pelo uso de medicamentos como  $\beta$ -bloqueadores, diuréticos, corticosteróides, imunossupressores, antirretrovirais dentre outros (GRANDJEAN e CROUSE, 2006; SBC, 2007).

A classificação laboratorial das dislipidemias é dada de acordo com a fração lipídica alterada (CRIQUI, 2009; IZAR et al, 2009) em:

- ✓ hipercolesterolemia isolada (LDL colesterol  $\geq$  160 mg/dL);
- ✓ hipertrigliceridemia isolada (triglicerol  $\geq$ 150 mg/dL);
- ✓ dislipidemias mista (LDL colesterol  $\geq$  160 mg/dL e triglicérides  $\geq$ 150 mg/dL);
- ✓ redução do HDL-C isolada (homens  $<$  40mg/dL e mulheres  $<$  50mg/dL);
- ✓ redução do HDL-C associada com aumento do colesterol e/ou do triacilglicerol.

As dislipidemias podem também ocorrer na infância, estando relacionadas com o sedentarismo, dieta inadequada e a síndrome metabólica (IZAR et al., 2009).

Gofman et al. (1950) relacionaram lipoproteínas de baixa e alta densidade, respectivamente LDL e HDL, com aterosclerose: a HDL possui um efeito na prevenção da aterogênese e a LDL é matéria fundamental na formação da placa aterosclerótica.

Hoje, sabe-se que altas concentrações de LDL é um fator de predisposição, pois a forma oxidada da LDL (LDLox) é reconhecida por receptores (*scavenger A-SRA* e o CD36) localizados na membrana plasmática dos macrófagos. Após fagocitose, a LDLox é acumulada nos macrófagos, que se transformam em células espumosas, produtoras de quimiocinas, substâncias que atuam na formação dos ateromas (ROCHA e LIBBY, 2009).

## **II – Obesidade**

A obesidade é definida como acúmulo excessivo de gordura decorrente do desequilíbrio energético entre ingestão calórica e gasto energético. A etiologia deste desequilíbrio não está completamente elucidada, mas acredita-se que a obesidade seja desencadeada pela interação entre fatores genéticos e ambientais, dentre eles, redução de atividade física e consumo excessivo de alimentos industrializados com alto teor de gorduras e carboidratos (CRIQUI, 2009; SANTOS, 2009).

O acúmulo de gordura visceral ocasiona alterações fisiológicas que predis põem ao aparecimento da aterosclerose, tais como: elevados níveis de LDL e baixos níveis de HDL (perfil lipídico pró-aterogênico); aumento da concentração de ácidos graxos não esterificados (NEFAs) na corrente sanguínea e liberação de citocinas pelo tecido adiposo, conhecidas por adipocitocinas e que atuam como mediadores bioativos da inflamação (PESEK et al., 2012).

## **III – Diabetes**

Na *Diabetes mellitus*, tipos 1 e 2, a elevada concentração de glicose no sangue causa a formação e deposição de produtos finais da glicosilação avançada, que promovem a oxidação de LDL e alteração do colágeno na túnica íntima. Os produtos finais da glicosilação avançada quando ligados à receptores nas células, ativam a liberação de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, que por sua vez, induzem a migração de monócitos e a proliferação de células musculares lisas, favorecendo a formação dos ateromas (ROCHA e LIBBY, 2009). Segundo Rocha e Libby (2009), o risco de DVC no

diabético é de oito vezes maior, além de dificultar o controle da glicemia, diminuição da ação da insulina e aumento do risco das complicações do *Diabetes mellitus* dos tipos 1 e 2, como a insuficiência vascular e lesão cerebral.

#### **IV – Sedentarismo**

As modificações do hábito de vida do ser humano na sociedade moderna têm levado à redução da atividade física, a qual de acordo com Matos et al. (2009) é fundamental para combater a doença arterial coronariana, pois dentre outros efeitos benéficos, estimula a vasculogênese e a função endotelial.

Por outro lado, o sedentarismo compromete a saúde, pois possui relação direta com a hipertensão arterial, dislipidemias, obesidade e diabetes do tipo 2. Segundo Matos et al. (2009), o sedentarismo na população brasileira é o fator de maior prevalência para aterosclerose (80,8%).

#### **V – Hipertensão Arterial**

A hipertensão arterial é um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, estando relacionada com 40% das mortes por acidente vascular cerebral e 25% das mortes por doença coronariana (POVOA e FILHO, 2009). Segundo Melo et al. (2007), existe relação direta entre hipertensão arterial e elevação de marcadores inflamatórios, o que contribui com a aterogênese.

#### **VI – Tabagismo**

Segundo Issa e Tokunaga (2009), aproximadamente, uma a cada cinco mortes por doenças cardiovasculares (DCV) são ocasionadas pelo tabagismo.

Os autores citam que o uso isolado do tabaco dobra a possibilidade de DCV e, que em associação com a alteração do colesterol ou à hipertensão arterial, o risco é quatro vezes maior. Se houver a união destes três fatores, o risco torna-se oito vezes maior.

O tabaco prejudica diretamente as funções vasculares, influenciando nas propriedades vasodilatadora, antitrombótica e fibrinolítica; acelerando a formação de LDLox e induzindo a inflamação (ROCHA e LIBBY, 2009). Issa e Takunaga (2009) descreveram os mecanismos fisiopatológicos dos danos cardiovasculares relacionados ao tabagismo, sendo estes diversos e muitas vezes sinérgicos, como:

- a. alteração das propriedades elétricas do coração: redução do tempo de condução átrio-ventricular, aumento da amplitude e duração do potencial de ação;
- b. efeito pró-coagulante;
- c. alterações metabólicas como a hiperinsulinemia e redução na concentração de HDL-colesterol;
- d. espessamento endotelial e formação de placas, pelo estímulo da proliferação de células musculares lisas que levam a hiperplasia da túnica íntima das artérias.

## **2.2. GÊNESE E FISIOPATOLOGIA DA ATEROSCLEROSE**

Atualmente, a hipótese mais aceita para o início do processo aterosclerótico é a “resposta à retenção”, a qual identifica lipoproteínas aterogênicas (LDL oxidada) como fator chave, por sua afinidade com o endotélio, seu acúmulo na camada íntima arterial, ativação das células

endoteliais e formação de uma resposta inflamatória subsequente (WOLF e LAWSON, 2012).

A patogênese das lesões ateroscleróticas é multifatorial, sendo um processo contínuo que pode levar ao aparecimento de sintomas clínicos (LUZ e LAURINDO, 2009; RUBIM, 2009; WOLF e LAWSON, 2012).

O desenvolvimento da aterosclerose é ocasionado pela resposta do endotélio a diversos estímulos de natureza mecânica, imunológica e química. O endotélio participa da regulação do tônus vascular, da resposta inflamatória, coagulação e fibrinólise e resposta imune, principalmente pela produção de óxido nítrico (NO), que é um potente vasodilatador que inibe a adesão leucocitária ao endotélio, evita a proliferação de células musculares lisas e limita a agregação plaquetária (SBC, 2007; RUBIM, 2009; LAKOTA et al. 2012).

Os mecanismos fisiopatológicos incluem alterações da hemodinâmica do fluxo sanguíneo em áreas de bifurcações vasculares, curvas arteriais e/ou de alta pressão (FUSTER, 2009; LUZ e LAURINDO, 2009; PESEK et al., 2012). Nestas regiões, há diminuição da produção de óxido nítrico (NO), aumento da produção de citocinas, acúmulo de LDL, expressão de moléculas de adesão celular (MACs), migração e acúmulo de monócitos/macrófagos, linfócitos T e mais recentemente, de mastócitos, os quais também desempenham importantes papéis no desenvolvimento do processo aterosclerótico (LUZ e LAURINDO, 2009; ROCHA e LIBBY, 2009; WOLF e LAWSON, 2012).

As citocinas produzidas e liberadas pelo endotélio, como a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-4; IL-6 e IL-18, estimulam de forma parácrina, o aumento da expressão de moléculas de adesão na membrana das células endoteliais, tais como a VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*), a ICAM-1 (*intercellular*

*adhesion molecule*), a E-selectina e a ELAM-1 (*endothelial leukocyte adhesion molecule*), os quais por sua vez, aumentam a adesão de leucócitos no endotélio e, sob influência de fatores quimioestáticos, sua migração para a região subendotelial. A proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) é uma quimiocina que promove o recrutamento dos monócitos, enquanto que a proteína 10 induzida por interferon (IP-10), a quimiocina- $\alpha$  de célula T induzida por interferon (I-TAC) e a monocina induzida por interferon- $\gamma$  (MIG) recrutam linfócitos (ROCHA e LIBBY, 2009).

A angiotensina II, importante na fisiopatologia inicial, causa a produção de espécies reativas de oxigênio ( $ERO_2$ ), de IL-6 (esta estimula a produção de proteína-C reativa - PCR - pelo fígado), da MCP-1 que hiper-regula a VCAM-1. Por sua vez, a PCR diminui a produção e biodisponibilidade de óxido nítrico. Tais modificações endoteliais promovem a inflamação e criam condições para o desenvolvimento da aterosclerose (LUZ e LAURINDO, 2009).

Os monócitos, após a adesão no endotélio via receptores quimiotáticos dos monócitos (CCR2; CCR5; CX3CR1), migram para o interior da túnica íntima. Ocorre sua proliferação e diferenciação em macrófagos pela ação do fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF). Os macrófagos, por sua vez, expressam receptores de membrana (*scavengers*), como CD36, LOX-1 e SR-A, responsáveis pela internalização de lipoproteínas modificadas (LDLox), formadas pela oxidação de moléculas de LDL subendoteliais pela ação de espécies reativas de oxigênio –  $ERO_2$  (LUZ e LAURINDO, 2009; ROCHA e LIBBY, 2009). Esta captação de LDLox confere aos macrófagos aspecto citoplasmático vacuolado e daí o nome de células espumosas. Estas produzem citocinas que exercem efeito quimiotático sobre leucócitos, estimulam a

proliferação de macrófagos e a expressão de receptores removedores de LDLox, importantes na formação das lesões iniciais da aterosclerose, também conhecido na literatura médica como estrias gordurosas (ROCHA e LIBBY, 2009).

Além dos macrófagos, os linfócitos T se acumulam nas lesões ateroscleróticas, onde desempenham funções auxiliares (CD25), estando em maior quantidade as células CD4<sup>+</sup> (LAKOTA et al., 2012). Os linfócitos T, mediante apresentação de antígeno pelos macrófagos, desencadeiam uma resposta adaptativa ou antígeno dependente. A principal resposta observada em placas ateroscleróticas é similar ao processo de hipersensibilidade tardia, subtipo Th1, onde há a liberação de vários mediadores químicos, como por exemplo o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). O IFN- $\gamma$  é uma citocina pró-inflamatória e pró-aterogênica, que estimula macrófagos a produzir mediadores pró-inflamatórios, impede a produção de matriz extracelular (MEC), mais especificamente a síntese de colágeno, e a proliferação das células musculares lisas (CML), além de induzir a apoptose em macrófagos e CML (LUZ e LAURINDO, 2009; ROCHA e LIBBY, 2009). A citocina TNF- $\alpha$ , também é um fator indutor da inflamação, ativando macrófagos e estimulando a proliferação de células musculares lisas (ROCHA e LIBBY, 2009). Outras secreções dos linfócitos T incluem proteases séricas que degradam os componentes da MEC, como por exemplo: colágeno, proteoglicanos, fibronectina e laminina (LUZ e LAURINDO, 2009). Contudo, a ativação de células T influencia negativamente a estabilidade das placas ateroscleróticas, podendo levar a sua desestabilização, formação de trombos e desenvolvimento de síndrome coronariana aguda.

Rocha e Libby (2009) em uma revisão a respeito dos antígenos candidatos a resposta imune nas placas ateroscleróticas, cita os possíveis candidatos:

- ✓ **LDL oxidada**, devido a presença de anticorpos ant-LDLox em estudos experimentais e em pacientes portadores de aterosclerose;
- ✓ **Proteínas de choque térmico (HSP)**, que normalmente são encontradas no interior das células, mas células danificadas produzem e liberam em grande quantidade HSP.

Os mastócitos são células conhecidas pela indução à hipersensibilidade do tipo I, mediada por IgE, por meio da liberação de histaminas (resposta alérgica), mas também regulam respostas inatas e adaptativas. Sua participação na patogênese da aterosclerose foi sugerida em 1953 e apenas a partir de 2007 surgiram estudos buscando entender o papel destas células no processo aterosclerótico (ROCHA e LIBBY, 2009).

Os mastócitos estão distribuídos em vários tecidos e órgãos do corpo, como na parede arterial (túnicas adventícia e íntima), sendo mais numerosos e ativados nas regiões de placas ateroscleróticas susceptíveis a erosão e ruptura. Eles podem ser ativados por vários estímulos, que no ateroma incluem LDLox, fatores inflamatórios e outras células da placa. Os mastócitos contribuem para o estado inflamatório e para a progressão da lesão aterosclerótica através da liberação de substâncias, como por exemplo (LUZ e LAURINDO, 2009; ROCHA e LIBBY, 2009):

- ✓ **Histaminas**, que facilitam o transporte de LDL plasmática para a túnica íntima;

- ✓ **Triptases, TNF- $\alpha$  e histaminas** que estimulam as células endoteliais (CE) a expressarem moléculas de adesão (P-selectina e VCAM-1);
- ✓ **TNF-  $\alpha$  e TNF- $\beta$**  que estimulam a expressão de MCP-1 pelas CE;
- ✓ **Proteases** que degradam componentes da matriz extracelular e alteram as LDL presentes na íntima;
- ✓ **Quinases** que inativam as moléculas de HDL (proteólise).

Os mediadores derivados dos mastócitos contribuem para a evolução crônica do ateroma e suas complicações trombóticas, por meio de vários mecanismos como a indução de apoptose de células musculares lisas e de células endoteliais e a degradação de componentes da matriz extracelular (ROCHA e LIBBY, 2009).

Segundo Rocha e Libby (2009), os mastócitos podem também ser ativados sem que ocorra sua desgranulação, podendo ainda secretar produtos não estocados em vesículas como prostaglandinas, leucotrienos e algumas citocinas e quimiocinas, importantes na patogênese da aterosclerose.

A progressão do ateroma se caracteriza pelo envolvimento de células musculares lisas (CML), que produzem matriz extracelular, composta principalmente por colágeno e lipídeos extracelulares contidos dentro de uma placa, o que determina as propriedades mecânicas da lesão. O conteúdo de colágeno, sua distribuição e adesão determinam as propriedades mecânicas das placas, sendo que as capas fibrosas finas, com grande núcleo lipídico necrótico, são as mais vulneráveis à ruptura (GROSS, 2009).

A matriz extracelular possui rigoroso controle de sua expressão e renovação, não ocupando apenas grande volume da placa avançada, como

também funções no processo evolutivo da mesma, tais como (ROCHA e LIBBY, 2009):

- ✓ fornecimento de sinais anti-apoptóticos, devido a presença de macromoléculas que funcionam como substrato para células da placa – endoteliais e musculares lisas;
- ✓ retenção de lipoproteínas;
- ✓ atuação como reservatórios de fatores de crescimento.

À medida que há progressão das placas ateroscleróticas, estas tornam-se organizadas, embora suas partes mais profundas sofram necrose (RUBIM, 2009). As principais enzimas envolvidas são as metaloproteinases (MMPs), que estão relacionadas à degradação da matriz extracelular; serinaproteinases e cisteinoproteinases (ROCHA e LIBBY, 2009). As cisteinoproteinases atuam no remodelamento vascular e na formação e ruptura da lesão aterosclerótica. A patologia da matriz extracelular contribui para o tráfego de leucócitos pela membrana basal, migração de células musculares lisas em direção à túnica íntima e a angiogênese, tornando a placa mais heterogênea, em relação ao infiltrado de células inflamatórias e à organização da matriz (placa fibroinflamatória).

Conforme exposto, a placa aterosclerótica plenamente desenvolvida é constituída por elementos celulares, matriz extracelular (com predomínio de colágeno, formando uma capa fibrosa) e núcleo lipídico (rico em colesterol). Como consequência, a luz do vaso é estreitada pela placa, havendo remodelamento da parede arterial, a fim de manter o diâmetro luminal, porém, quando o comprometimento da luz atinge 50% ou mais, a remodelagem

compensatória não consegue manter o fluxo normal, dando origem a estenose (RUBIM, 2009).

As placas ateroscleróticas podem ser classificadas de acordo com suas características estruturais em placas estáveis ou instáveis. As placas estáveis caracterizam-se pela presença de uma capa fibrosa espessa, com predomínio de colágeno, escassas células inflamatórias e núcleo lipídico em proporções menores. Já as placas instáveis apresentam atividade inflamatória intensa, principalmente em suas bordas laterais, com alta atividade proteolítica, núcleo lipídico proeminente e uma fina capa fibrótica. Estas placas instáveis tendem a apresentar ruptura desta capa com exposição do material lipídico de seu interior, o qual é altamente trombogênico. Este processo denomina-se aterotrombose, um dos principais determinantes das manifestações clínicas da aterosclerose (SBC, 2007).

Para que a prevenção da aterosclerose possa ser eficaz, os fatores de risco que levam a esta doença devem ser bem compreendidos para serem combatidos. Dessa forma, além do uso de fármacos, a prática de atividade física regular, a eliminação de hábitos de risco, como o tabagismo, e a adoção de uma dieta equilibrada também são necessários para o controle da progressão da aterosclerose, com conseqüente aumento da expectativa e da qualidade de vida (GIROLDO et al., 2007). Além disso, várias pesquisas têm constado que a alimentação com baixo teor de gordura saturada e colesterol e rica em ácidos graxos poliinsaturados e antioxidantes tem sido uma aliada no controle e prevenção da aterosclerose.

### 2.3. MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDO DA ATEROSCLEROSE

Lesões ateroscleróticas têm sido relatadas durante necropsias de rotina em suínos, patos, aves domésticas, pombos, papagaios, alguns marsupiais (incluindo cangurus) e ocasionalmente em leões marinhos e ursos (GROSS, 2009). Vastesaeger e Delcourt (1962), examinando a aorta e artérias coronárias de vertebrados em cativeiro e de vida livre, detectaram a presença de aterosclerose coronariana nesses animais.

Outros autores buscaram identificar a aterosclerose em animais silvestres, por meio de análise histológica e histoquímica de lesões na aorta e artérias coronárias. Cucu (1976) avaliou 48 animais adultos *Cervus elaphus* (veados da montanha) e identificou que 44,44% dos animais apresentavam lesões graves com placas fibrosas e/ou espessamento da parede com depósito de lipídeos ou estrias gordurosas.

Estudos da patogênese e tratamento da aterosclerose utilizam várias espécies animais, como primatas não-humanos, suínos, coelhos, hamsters, pombos, ratos e cães (JAWIEŃ et al., 2004). Gross (2009) e Jawieñ et al. (2004) citam algumas particularidades de alguns destes modelos:

- ✓ **Coelhos** (*Oryctolagus cuniculus*): utilizados há mais de 100 anos em pesquisas sobre os mecanismos da aterogênese, possuem diferenças significativas nas lesões ateroscleróticas quando comparadas as de seres humanos, como a presença de mineralização e a maior concentração de lipídios e macrófagos infiltrados, além dos níveis de colesterol no plasma que são muito elevados. No entanto, estes animais ainda são utilizados em pesquisas devido ao baixo custo, facilidade de obtenção e manejo.

- ✓ **Primatas não humanos** são os modelos experimentais mais adequados para estudo das lesões ateroscleróticas por serem onívoros, próximos filogeneticamente ao ser humano, apresentarem metabolismo e terem a aterogênese semelhante, que progride com o envelhecimento, como ocorre com o *Homo sapiens*. Atualmente não são usados devido ao custo de manejo, risco de transmissão de zoonoses virais e a questões éticas.
- ✓ **Porcos domésticos** (*Sus scropha domesticus*) são animais onívoros, com sistema cardiovascular e metabolismo semelhantes ao dos seres humanos. Quando alimentados com uma dieta rica em colesterol, alcançam níveis plasmáticos e lesões ateroscleróticas que são semelhantes às observadas em humanos, o que os torna um bom modelo para estudo da aterosclerose. Ramos et al. (2007) sugerem que as lesões ateroscleróticas em suínos de raça Alentejana podem surgir mesmo em animais alimentados com dieta sem adição de colesterol. Contudo, os custos e as dificuldades na manutenção das colônias e no manejo dos animais os tornam uma espécie pouco utilizada nas pesquisas sobre aterosclerose. Os suínos miniaturas ou *Minipigs BR*, desenvolvidos no Brasil, tem sido utilizados em pesquisa (DAMY et al., 2010).
- ✓ **Roedores** (camundongos – *Mus musculus* – e ratos – *Rattus norvegicus*) apesar de serem animais sociais, altamente adaptáveis, onívoros e possuírem metabolismo semelhante ao de seres humanos, não são bons modelos de estudo para aterosclerose porque, normalmente, não desenvolvem lesões ateroscleróticas espontaneamente e exigem grandes modificações na dieta para que haja a lesão vascular. Contudo,

após 1992 o número de pesquisas utilizando camundongos como modelos experimentais dos mecanismos aterogênicos ganhou impulso, graças ao uso de linhagens manipuladas geneticamente, principalmente as *knockout*, como por exemplo: os modelos de exclusão para as apolipoproteínas AI, AII, AIV, AV, B100, B48, CI, CII, CIII, E.

As principais características que devem estar presentes no modelo animal para pesquisas da aterosclerose, de acordo com Gross (2009), são:

- ✓ ser acessível e barato;
- ✓ ser de fácil manutenção e manipulação;
- ✓ ter linhagens puras;
- ✓ se reproduzir facilmente em cativeiro;
- ✓ desenvolver lesões típicas com relativa facilidade, em pouco tempo;
- ✓ apresentar baixa incidência de outras doenças espontâneas;
- ✓ que tenha características anatômicas, fisiológicas e bioquímicas, incluindo semelhança com as lipoproteínas do soro e metabolismo lipídico equivalentes com as de seres humanos;
- ✓ possuir patogênese das lesões semelhante aos seres humanos, com a presença de componentes e complicações clínicas de ruptura das lesões.

### 2.3.1. Linhagem apoE<sup>-/-</sup>

A espécie de camundongo *Mus musculus* possui valores de referência fisiológicos e bioquímicos bem descritos na literatura, dentre eles: **longevidade**: 1,5 a 3 anos; **idade de desmame**: 21 a 28 dias; **início da vida reprodutiva**: 50 dias nos machos e 50 a 60 dias nas fêmeas; **duração da vida útil reprodutiva**: em biotério de 7 a 9 meses; **massa corporal**: 20 a 40 gramas; **consumo médio**

**de alimento:** 15g para cada 100g de massa do animal por dia; **concentração de colesterol sérico:** 26 mg/dL a 96mg/dL (CATÃO-DIAS et al., 2006)

Desde a década de 1990, várias linhagens de camundongos geneticamente modificadas foram desenvolvidas para servirem como modelos experimentais da aterosclerose. Entre estes modelos, estão os camundongos deficientes para apolipoproteína E ( $apoE^{-/-}$ ), os quais têm particular relevância devido à sua propensão para desenvolver hipercolesterolemia e lesões ateroscleróticas espontâneas, semelhantes às encontradas em seres humanos, mesmo quando alimentados com uma dieta padrão (MEYRELLES et al., 2011). Gross (2009) relatou que os camundongos  $apoE^{-/-}$  são a única linhagem desta espécie que desenvolve lesões ateroscleróticas extensas na raiz da aorta quando alimentados com dieta normal e cita que quando alimentados com dieta rica em colesterol, desenvolvem um padrão de aterosclerose mais amplo, distribuída de forma semelhante à encontrada nos seres humanos.

Van Craeyveld et al. (2012) estudaram a progressão da aterosclerose em quatro modelos animais diferentes, dentre eles os camundongos  $apoE^{-/-}$ . As fêmeas  $apoE^{-/-}$  com 5 e 8 meses de idade apresentaram áreas de lesão maiores em comparação aos machos, mas quando os animais chegavam a 21 meses de idade, não havia diferença significativa, das lesões entre os sexos. Isto foi observado também por outros autores. Meyrelles et al. (2011) também citaram uma diferença entre os sexos de animais  $apoE^{-/-}$ , pois fêmeas com 8 a 10 meses de idade possuíam espessamento da túnica íntima e média maior que o dos machos. Adicionalmente, Smith (2010) demonstrou que fêmeas de camundongos  $apoE^{-/-}$  são propensas a desenvolver lesões ateroscleróticas maiores que as dos machos, estando este aumento associado com a elevação

da produção de tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e diminuição da produção de prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>).

Segundo Jawieñ et al. (2004), os estudos envolvendo a linhagem apoE<sup>-/-</sup> buscam identificar os genes que levam à aterosclerose, descrever as funções das células inflamatórias na aterogênese, identificar os fatores ambientais que influenciam na aterogênese e avaliar as terapias que possam bloquear a aterogênese ou a progressão das placas ateroscleróticas.

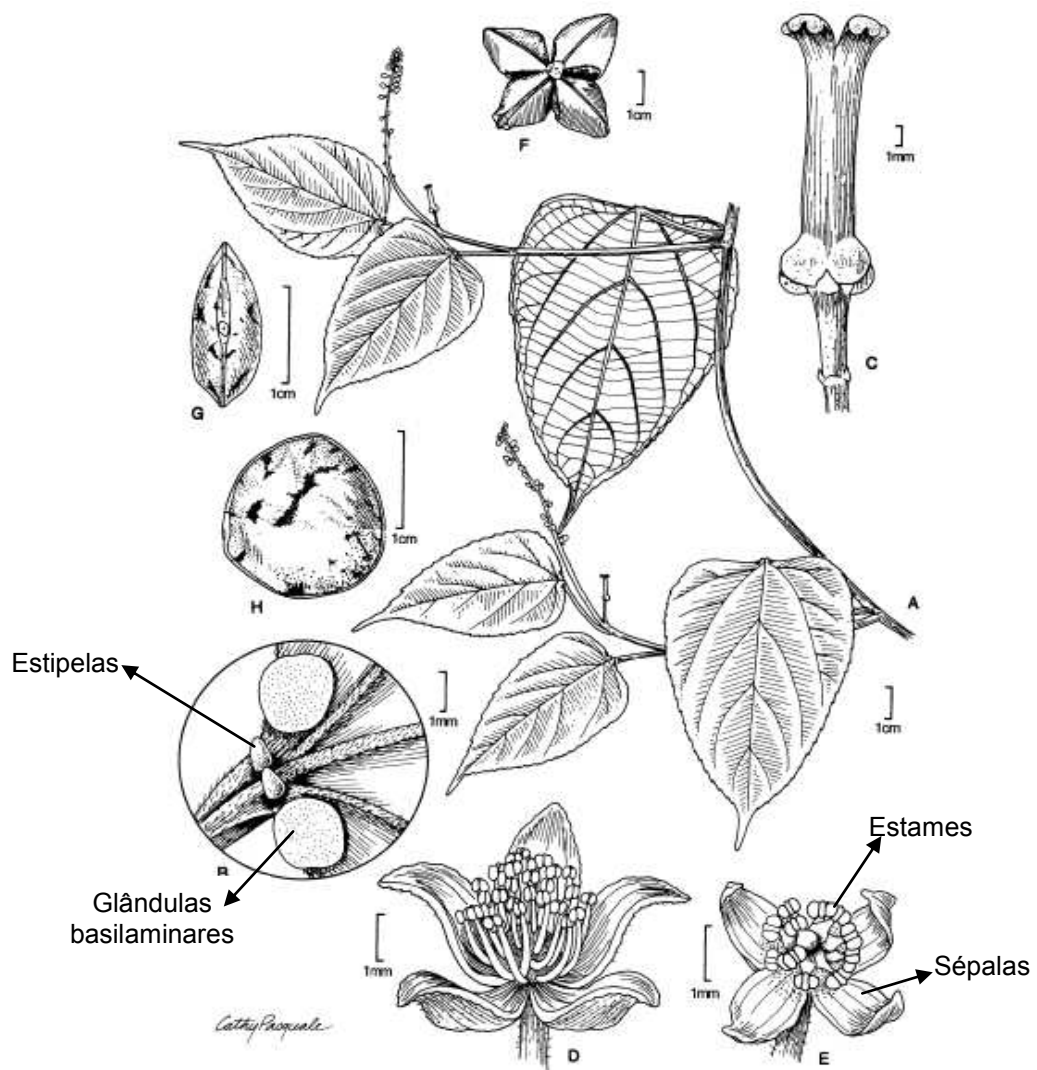
#### **2.4. *Plukenetia volubilis***

A *Plukenetia volubilis* é uma planta trepadeira, semilenhosa e perene, que atinge dois a três metros de altura. Ocorre no norte e oeste da Bacia Amazônica, sendo encontrada também em vários países da América Latina, dentre eles, Bolívia, Colômbia, Equador, México, Peru e Venezuela (GILLESPIE, 1993; RAMÍREZ et al., 2000). É conhecida por vários nomes populares: sacha kiruma, sacha inchi e amendoim inca (GUTIÉRREZ et al., 2011). Esta espécie pertence à família Euphorbiaceae, a qual reúne diversas espécies de interesse, dentre elas: *Hevea brasiliensis* (seringueira – maior fonte de látex natural); *Hippomane mancinella* (cujo látex é utilizado como veneno nas pontas de flechas utilizadas na captura de peixes); *Manihot esculenta* (mandioca – importante fonte de amido nas regiões tropicais); e espécies avaliadas como fontes alternativas de biodiesel: *Cnidoscolus phyllacantus* (faveleira – planta da caatinga nordestina); *Jatropha curcas* (pinhão manso) e *Ricinus communis* (mamona) (JUDD et al., 2009; CUNHA et al., 2010).

As principais características botânicas do gênero *Plukenetia* são: plantas dióicas, sem látex, folhas simples, alternadas, serrilhadas, com glândulas

elípticas na base do feixe vascular, com nervuras palmadas ou pinadas e estípulas pequenas (GILLESPIE, 1993; GILLESPIE, 2007 e RAMÍREZ et al., 2000) (**Figura 1**).

A espécie *P. volubilis* possui frutos, em forma de estrela de 3 a 5 cm de diâmetro, de coloração verde ou castanho-escuro (quando maduros), apresentando, normalmente, 4 lóbulos (RUIZ-SOLSOL e MESÉN, 2010) (**Figura 1 - F**). As suas sementes e folhas são utilizadas na dieta das tribos amazônicas (GUILLÉN et al, 2003). Outra característica observada por Gutierrez et al. (2011), ao analisarem a composição química das sementes de *P. volubilis*, foi a presença de alto teor de lipídios, além de níveis significativos de proteínas e carboidratos (**Tabela 1**). As concentrações de lipídios das sementes obtidas por estes autores são semelhantes a de outros trabalhos, como por exemplo, Follegatti Romero (2007), que detectou 54% de gordura. Guillén et al. (2003) e Yang e Lallio (apud GUTIÉRREZ et al., 2011) relataram que concentração de gordura nas sementes de *P. volubilis* seria em torno de 35 a 60%, sendo estas diferenças atribuídas a diferenças presentes entre subespécies, às condições geográficas e climáticas, ao tempo de colheita das sementes e ao método de extração dos lipídeos.



**Figura 1:** *Plukenetia stipellata* e *Plukenetia volubilis*. **A)** Hábito de *Plukenetia*: trepadeira; **B)** Lado adaxial da base da folha de *P. stipellata*, mostrando par de estipelas entre o par de glândulas basilaminares. *P. volubilis* não possui par de estipelas, embora apresente glândula basilaminar única. **C)** Pistilo da flor; **D)** Flor estaminada de *P. stipellata* com cinco sépalas e 25 a 40 estames; **E)** Flor estaminada de *P. volubilis* com 16 a 30 estames robustos e cônicos de 0,4 a 0,5 mm de comprimento e 4 sépalas; **F)** Cápsula seca do fruto tetralocado; **G)** Semente em vista ventral; **H)** Semente em vista lateral. Adaptado de Gillespie (1993). **I)** e **J)** Fotografias da *P. volubilis* cultivada em Viçosa, MG.

**Tabela 1:** Composição química das sementes de *Plukenetia volubilis* L. e propriedades físico-químicas do óleo bruto. Adaptado de Gutiérrez et al. (2011)

| COMPONENTE                              | VALOR             |
|---|-------------------|
| SEMENTES                                |                   |
| Umidade (%)                             | 3,3 ± 0,3         |
| <b>Gordura (%)</b>                      | <b>42,0 ± 1,1</b> |
| <b>Proteína (%)</b>                     | <b>24,7 ± 0,5</b> |
| Carboidratos totais (%)                 | 30,9 ± 0,6        |
| Potássio (mg / kg)                      | 5563,5 ± 6,4      |
| Magnésio (mg / kg)                      | 3210,0 ± 21,2     |
| Cálcio (mg / kg)                        | 2406,0 ± 7,1      |
| Ferro (mg / kg)                         | 103,5 ± 8,9       |
| Zinco (mg / kg)                         | 49,0 ± 1,1        |
| Sódio (mg / kg)                         | 15,4 ± 0,5        |
| ÓLEO BRUTO                              |                   |
| Iodo – valor (mg I <sub>2</sub> /100 g) | 193,1 ± 1,0       |
| Saponificação – valor (mg KOH / g)      | 185,2 ± 0,5       |
| Índice de refração a 25° C              | 1,4791 ± 0,0009   |
| Densidade a 25° C (g/cm <sup>3</sup> )  | 0,9187 ± 0,02     |
| Viscosidade a 20° C (mPa × s)           | 35,4 ± 0,4        |

Média ± desvio padrão das determinações feitas em triplicata.

O principal produto obtido de *P. volubilis* é o óleo extraído das sementes, o qual possui alto teor em ácidos graxos insaturados, que atuam na prevenção de doenças cardiovasculares e dislipidemias, podendo ser usado como suplemento alimentício (GARMENDIA et al., 2011; GUTIÉRREZ et al., 2011).

Segundo Follegatti Romero (2007) e Fanali et al. (2011) diferentes metodologias podem ser utilizadas para o processo de extração do óleo de sementes, tais como:

- a. **Extração por prensagem:** processo realizado por prensas que possui baixa eficiência, sendo recomendado para óleos ou gorduras sensíveis a altas temperaturas;

- b. **Extração por solvente:** inclui basicamente a limpeza da semente, laminação, prensagem, extração com solvente (sendo o hexano o mais utilizado), recuperação do solvente, refino e a estabilização do óleo;
- c. **Extração supercrítica:** utiliza o poder de solvência de fluidos supercríticos em temperaturas e pressões próximas ao ponto crítico, como por exemplo o dióxido de carbono.

Follegatti Romero (2007), analisando a composição química de ácidos graxos do óleo de *P. volubilis* obtido por dois processos de extração, a supercrítica e a feita através do uso de solvente, não constatou diferença nas características bioquímicas do óleo extraído por esses dois processos.

Gomez et al. (1996), Bozan e Temelli (2002) e Nodar et al. (2002) também compararam esses mesmos processos de extração na obtenção de óleo a partir de sementes de linhaça, soja e uva, respectivamente, e não observaram variações significativas na composição de ácidos graxos dos óleos obtidos.

O óleo de *P. volubilis*, graças a sua composição, tem importância nutricional, além de potencial para ser utilizado como matéria prima na produção de fármacos e cosméticos (HAMAKER et al., 1992; GUILLÉN et al., 2003; FOLLEGATTI ROMERO, 2007; FANALI et al., 2011; GUTIÉRREZ et al., 2011) (**Tabela 2**).

Vários estudos têm obtido resultados positivos na utilização de fontes nutricionais com elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados no controle dos fatores de risco das doenças cardiovasculares (KRIS-ETHERTON et al., 2002; TAPSELL et al., 2004; HUAMÁN et al., 2008; SAREMI e ARORA, 2009; SABATÉ et al., 2010; GARMENDIA et al., 2011). Portanto, a falta de informação

na literatura sobre os efeitos do óleo de *P. volubilis* na prevenção da aterosclerose e o fato desta ser uma planta perene, rústica e de fácil cultivo em regiões tropicais, justificaram a realização do presente trabalho.

**Tabela 2:** Composição dos principais ácidos graxos de óleos extraídos de diferentes espécies. Valores médios (%)

| ÁCIDOS GRAXOS (%)                  |  | <i>P. volubilis</i> <sup>a*</sup> | Linhaça <sup>b</sup> | Canola <sup>c</sup> | Soja <sup>d</sup> | Peixe <sup>e</sup> |
|------------------------------------|--|-----------------------------------|----------------------|---------------------|-------------------|--------------------|
| <b>SATURADOS</b>                   | Palmítico – C16:0                                      | 4,10                              | 6,20                 | 4,50                | 9,35              | 10,70              |
|                                    | Heptadecanóico – C17:0                                 | 0,00                              | 2,15                 | 0,00                | 1,00              | 3,60               |
|                                    | Esteárico – C18:0                                      | 1,50                              | 1,00                 | 1,00                | 1,33              | 0,00               |
| <b>INSATURADOS</b>                 | <b>ω9</b> Oléico – C18:1n <sup>o</sup> <sub>c</sub>    | 8,13                              | 19,13                | 61,10               | 22,57             | 9,90               |
|                                    | <b>ω3</b> α-Linolênico – C18:3n <sup>3</sup>           | 48,42                             | 54,33                | 8,10                | 6,60              | 0,80               |
|                                    | <b>ω6</b> Linoléico – C18:2n <sup>6</sup> <sub>c</sub> | 36,25                             | 17,29                | 21,20               | 57,35             | 2,70               |
| <b>Σ Saturados</b>                 |  | <b>6,60</b>                       | <b>8,67</b>          | <b>5,50</b>         | <b>11,68</b>      | <b>14,30</b>       |
| <b>Σ Poliinsaturados (ω3 e ω6)</b> |  | <b>84,67</b>                      | <b>71,62</b>         | <b>29,30</b>        | <b>63,95</b>      | <b>3,50</b>        |
| <b>Relação ω6:ω3</b>               |  | <b>0,75</b>                       | <b>0,32</b>          | <b>2,62</b>         | <b>8,69</b>       | <b>3,38</b>        |

**Fontes:**

<sup>a</sup> Hamaker et al. (1992); Guillén et al. (2003); Follegatti Romero (2007); Fanali (2011).

<sup>b</sup> Guillén et al. (2003); Dyer (2008); Rosa (2010).

<sup>c</sup> Dyer (2008); Scherr e Ribeiro (2010).

<sup>d</sup> Dyer (2008); Rosa (2010); Scherr e Ribeiro (2010).

<sup>e</sup> Rosa (2010).

\* Teor de tocoferóis de 238,72mg/100g (FOLLEGATTI ROMERO, 2007).

## 2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAM, A.H.; THOMPSON, R.C.; WANN, L.S.; MIYAMOTO, M.I.; NUR EL-DIN AEL, H.; EL-MAKSOU, G.A., et al. Atherosclerosis in ancient Egyptian mummies: the Horus study. **JACC Cardiovasc. Imaging**. v.4(4): p.315-327. 2011.

BOZAN, B. e TEMELLI, F. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of flaxseed. **JAACS**. 79: p.231-235, 2002.

CATÃO-DIAS, J.L.; CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R. **Tratado de Animais Silvestres**. 1ªed. São Paulo: Editora Roca. 2006. 1376p.

CRIQUI, M.H. Epidemiologia da doença cardiovascular. In: GOLDMAN, L. e AUSIELLO, D. Editores. **Cecil Medicina**. 23ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. Seção VIII (capítulo 49), p. 361-366.

CUCU, F. Spontaneous aorta and coronary lesions in mountain mammals. I. The Carpathian deer (*Cervus elaphus*). **Med. Interne**. 14(3): p.215-218, 1976.

CUNHA, J. R.; FREIRE, D.L.; FERREIRA, M.C.; BEZERRA, P.D.F.; MELO, Y.L.; MACÊDO, C.E.C.; MAIA, J.M. Germinação de faveleira sob condições de estresse hídrico. **Anais do Congresso Brasileiro de Mamona, 4 e Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, 1**. João Pessoa. 2010. p.894-898.

DAMY, S.B.; CAMARGO R.S.; CHAMMAS. R.; FIGUEIREDO, L.F.P. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. **Rev. Assoc. Med. Bras**. v.56 (1). 2010.

DYER, J. M.; STYMNE, S.; GREEN, A. G.; CARLSSON, A. S. High-value oils from plants. **The Plant Journal**. 54(4): p.640-655, 2008.

FANALI, C.; DUGO, L.; CACCIOLA, F.; BECCARIA, M; GRASSO, S.; DACHÀ, M.; DUGO P.; MONDELLO, L. Chemical characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. **J. Agric. Food. Chem**. 59(24): p.13043-1349. 2011.

FOLLEGATTI ROMERO, L.A. **Extração de óleo de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) com dióxido de carbono**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 95p, 2007.

FUSTER, V. Aterosclerose, trombose e biologia vascular. In: GOLDMAN, L. e AUSIELLO, D. Editores. **Cecil Medicina**. 23ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. Seção VIII (capítulo 69), p. 553-559.

GARMENDIA, F.; PANDO, R.; RONCEROS, G. Efecto del aceite de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) sobre el perfil lipídico en pacientes com hiperlipoproteinemia. **Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica**. 28(4): p.628-632. 2011.

GHOSH, S. Macrophage cholesterol, homeostasis and atherogenesis: critical role of intracellular cholestery ester hydrolysis. In: PARTHASARATHY, S. **Atherogenesis**. InTech. 2012. Capítulo 14: 305-326.

GILLESPIE, L. J. A Revision of Paleotropical *Plukenetia* (Euphorbiaceae) Including Two New Species from Madagascar. **Systematic Botany**. 32(4): p.780-802. 2007

GILLESPIE, L. J. A Synopsis of Neotropical *Plukenetia* (Euphorbiaceae) including two new species. **Systematic Botany**. 18 (4): p.575-592. 1993.

GIROLDO, M.L.; ALVEZ, A.S.; BAPTISTA, F. Doença aterosclerótica: uma patologia multi-fatorial. **SaBios-Ver. Saúde e Biol**. v.2 (1): p.32-41. 2007.

GOFMAN, J.W.; JONES, H.B.; LINDGREN, F.T.; LYON, T.P.; ELLIOT, H.A.; STRISOWER, B. Blood lipids and human atherosclerosis. **Circulation**. 2: p.161-178. 1950.

GOMEZ, A.M.; LOPEZ, C.P.; MARTINEZ de la OSSA, E. Recovery of grape seeds oil by liquid and supercritical carbon dioxide extraction: a comparison with conventional solvent extraction. **The Chemical Engineering Journal**. 61: p.227-231. 1996.

GRANDJEAN, P. e CROUSE, S.F. Distúrbios dos Lipídeos e das Lipoproteínas. In: **Fisiologia do exercício clínico**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006, Capítulo 5. p. 47-73.

GROSS, D. R. **Animal Models in Cardiovascular Research**. 3ª Ed. New York: Springer. 2009. 431p.

GUILLÉN, M. D.; RUIZ, A.; CABO, N.; CHIRINOS, R.; PASCUAL, G. Characterization of Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil by FTIR spectroscopy and HNMR. Comparison with linseed oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 80: p.755-762. 2003.

GUTIÉRREZ, L.F.; ROSADAB, L.M.; JIMÉNEZA, A. Chemical composition of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction. **Grasas y Aceites**, 62 (1): p. 76-83. 2011.

HAGVE, T.A.; WOLDSETH, B.; BROX, J.; NARCE, M.; POISSON, J.P. Membrane fluidity and fatty acid metabolism in kidney cells from rats fed purified eicosapentaenoic acid or purified docosahexaenoic acid. **Scand J Clin Lab Invest** 58(3): p.187-94, 1998.

HAMAKER, B.R.; VALLES, C.; GILMAR, R.; HARDMEIER, R.M.; CLARK, D.; GARCIA, 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: p.461-463. 1992.

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. **An. Fac. Med.** 69(4): p.263-266. 2008.

ISSA, J.S. e TOKUNAGA, P.S.L. Tabagismo e doença cardiovascular. In: SERRANO Jr., C.V.; TIMERMAN, A.; STEFANINI, E. Editores. **Tratado de Cardiologia – SOCESP**. 2ª ed., Barueri, SP: Manole, 2009. Seção 6 (capítulo 3), p: 527-540.

IZAR, M.C.O; KASINSKI, N; FONSECA, F.A.H. Dislipidemias: diagnostico e tratamento. In: SERRANO Jr., C.V.; TIMERMAN, A.; STEFANINI, E. Editores. **Tratado de Cardiologia – SOCESP**. 2ª ed., Barueri, SP: Manole, 2009. Seção 6 (capítulo 6), p: 562-583.

JAWIEŃ, J.; NASTALEK, P.; KORBUT, R. Mouse models of experimental atherosclerosis. **J. Physiol. and Pharmac.** 55(3): p.503-517. 2004.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed. 2009. 632p.

KRIS-ETHERTON, P.M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. **Circulation**.106: p.2747-2757. 2002.

LAKOTA, K.; ARTENJAK, A.; CUCNIK, S.; BRGULJAN-HITIJ, J; CEGOVNIK, B. et al. Atherogenesis, inflammation and autoimmunity – na overview. In: PARTHASARATHY, S. **Atherogenesis**. InTech. Capítulo 9. p.187-199. 2012.

LUZ, P.L. e LAURINDO, F.R. Inflamação e aterosclerose. In: SERRANO Jr., C.V.; TIMERMAN, A.; STEFANINI, E. Editores. **Tratado de Cardiologia – SOCESP**. 2ª ed., Barueri, SP: Manole, 2009. Seção 3 (capítulo 4), p: 139-152.

MATOS, L.D.N.J.; TROMBETTA, I.C.; NEGRÃO, C.E. Sedentarismo e benefícios da atividade física. In: SERRANO Jr., C.V.; TIMERMAN, A.; STEFANINI, E. Editores. **Tratado de Cardiologia – SOCESP**. 2ª ed., Barueri, SP: Manole, 2009. Seção 6 (capítulo 2), p: 517-526.

McGUINNESS, J.; NEILAN, T.G.; SHARKASI, A.; BOUCHIER-HAYER, D.; REDMOND, J.M. Wish oil for the treatment of cardiovascular disease. **Cardiology in Review**. 18 (5): p.258-263. 2010.

MELO, S.E.S.F.C.; YUGAR-TOLEDO, J.C.; COCA, A.P. JUNIOR, H.M. Hipertensão arterial, aterosclerose e inflamação: o endotélio como órgão-alvo. **Ver. Bras. Hipertens.** 14(4): p.234-238, 2007.

MEYRELLES, S.S.; PEOTTA, V.A; PEREIRA, T.M.C.; VASQUEZ, E.C. Endothelial Dysfunction in the Apolipoprotein E-deficient Mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. **Lipids In Health and Disease**. 2011, 10:211. <http://www.lipidworld.com/content/10/1/211>

NODAR, M.D.; GÓMEZ, A.M.; MARTINEZ de la OSSA, E. Characterisation and process development of supercritical fluid extraction of soybean oil. **Food Sci. Tech. Int.** 8: p.337-342, 2002.

PESEK, K; PESEK, T; ROGINIC, S. The importance of risk factors analysis in the prevention of cardiovascular disease (CVD). In: PESEK, K. **Atherosclerotic Cardiovascular Disease**. InTech. 2012. Capítulo 1: p.3-32.

PÓVOA, R.M.S. e FILHO, B.L. Hipertensão arterial como fator de risco. In: SERRANO Jr., C.V.; TIMERMAN, A.; STEFANINI, E. Editores. **Tratado de Cardiologia – SOCESP**. 2ª ed., Barueri, SP: Manole, 2009. Seção 6 (capítulo 4), p: 541-546.

RAMÍREZ, J.J.; GORDILLO, M.M.; DURAN, R.C. El género *Plukenetia* (Euphorbiaceae) em México. **Anales Del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Série Botânica** 71(1): p.11-18. 2000.

RAMOS, A; BENTO, O.; LANÇA, M.; MARTINS, J.; CAPELA, F.; FREITAS, A. Estudo histopatológico de lesões ateroscleróticas em suínos da raça Alantejana. **Revista Portuguesa de Ciências Agrárias**. 30(1): p.323-330. 2007.

ROCHA, V.Z. e LIBBY, P. Biologia vascular da aterosclerose e complicações agudas do ateroma. In: SERRANO Jr., C.V.; TIMERMAN, A.; STEFANINI, E. Editores. **Tratado de Cardiologia – SOCESP**. 2ª ed., Barueri, SP: Manole, 2009. Seção 3 (capítulo 7), p:172-189.

ROSA, D.D. **Lesões pré-neoplásicas, perfil lipídico, marcadores inflamatórios e aspecto histológico intestinal de ratos wistar alimentados com dieta à base de diferentes óleos**. Universidade Federal de Viçosa. 2010. Dissertação de Mestrado. 127p.

RUBIN, E.R. **Rubin, patologia**: bases clinicopatológicas da medicina. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 495 – 509.

RUIZ-SOLSOL, H. e MESÉN, F. Efecto del ácido indolbutírico y tipo de estaquilla en el enraizamiento de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.). **Agronomía Costarricense**. 34(2): p.259-267. 2010.

SABATÉ, J.; ODA, K.; ROS, E. Nut consumption and blood lipid levels: a pooled analysis of 25 intervention trials. **Arch Intern Med**. 170(9): p.821-827. 2010.

SANTOS, J.E. Obesidade e sobrepeso. In: SERRANO Jr., C.V.; TIMERMAN, A.; STEFANINI, E. Editores. **Tratado de Cardiologia – SOCESP**. 2ª ed., Barueri, SP: Manole, 2009. Seção 6 (capítulo 1), p: 511-516.

SAREMI, A. e ARORA, R. The utility of omega-3 fatty acids in cardiovascular disease. **Am J Ther**. 16(5): p.421-436. 2009.

SBC – SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz de prevenção da aterosclerose na infância e na adolescência. **Arq. Bras. Cardiol**. v.85 (suppl. VI): 36p. 2005.

SBC – SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose do Departamento de aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.** v.88 (suppl. I): 19p. 2007.

SCHERR, C. e RIBEIRO, J. P. Gorduras em laticínios, ovos, margarinas e oleos: implicações para a aterosclerose. **Arq. Bras. Cardiol.** 95(1): p.55-60, 2010

SILVA, J.C.C.B; MORAES, M.R.S.; HAN, S.W. **Doença aterosclerótica generalizada e aterotrombose: da ciência experimental à abordagem clínica e à terapia gênica.** In: Doença Aterosclerótica Periférica. São Paulo: BBS Editora. 2004. Cap. 2, p. 29-50.

TABAS, I. **Lipids and atherosclerosis.** In: Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. 5ed. Elsevier. 2008. Cap. 21, p. 579-605.

TAPSELL, L.C.; GILLEN, L.J.; PATCH, C.S.; BATTERHAM, M.; OWEN, A.; BARÉ, M.; KENNEDY, M. Including walnuts in a low-fat/modifiedfat diet improves HDL cholesterol-to-total cholesterol ratios in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care.** 27(12): p.2777-2783. 2004.

THEROUX, P. **Acute Coronary Syndromes:** a companion to Braunwald's heart disease. 2. ed., Saunders, USA: Elsevier, 2011, cap. 6.

VAN CRAEYVELD, E.; GORDTS, S.C.; SINGH, N.; JACOBS, F.; DE GEEST, B. A critical reassessment of murine and rabbit models of atherosclerosis: focus on lesion progression and remodelling. **Acta Cardiol.** 67(1):p.11-21. 2012.

VASTESAEGER, M.M. e DELCOURT, R. The natural history of atherosclerosis. **Circulation.** 26: p.841-855. 1962.

WALLACE, F.A.; MILES, E.A.; CALDER, P.C. Comparison of the effects of linseed oil and different doses of fish oil on mononuclear cell function in healthy human subjects. **Br J Nutr** 89(5): p.679-689. 2003.

WOLF, S. I, e LAWSON, C. ICAM-1: contribution to vascular inflammation and early atherosclerosis. In: SQUERI, A. **Coronary artery disease – new insights and novel approaches.** InTech. 2012. Capítulo 3: 65-90.

YANG, B. e KALLIO, H. Effects of harvesting time on triacylglycerols and glycerophospholipids of sea buckthorn (*Hippophaë hamnoides* L.) berries of different origins. **J. Food Compos. Anal.** 15: p.143–157, 2002, apud GUTIÉRREZ, L.F.; ROSADAB, L.M.; JIMÉNEZA, A. Chemical composition of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction. **Grasas y Aceites**, 62 (1): p.76-83, 2011.

YOSHIDA, W.B. **O processo aterosclerótico: da disfunção endotelial à lesão complexa.** In: Doença Aterosclerótica Periférica. São Paulo: BBS Editora. 2004. Capítulo 1, p.11-28.

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. **Arterioscler Trhom. Basc. Biol.** 27: p.1706-1720, 2007.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. OBJETIVO GERAL

- ✓ Estudar os efeitos da dieta enriquecida com o óleo das sementes de *Plukenetia volubilis* na composição lipídica do fígado e tecido adiposo e na histopatologia do tronco aórtico de camundongos C57BL/6 e apoE<sup>-/-</sup>.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obter e caracterizar o perfil bioquímico do óleo das sementes de *Plukenetia volubilis* cultivadas no município de Viçosa, MG;
- ✓ Investigar os efeitos da dieta enriquecida com o óleo das sementes de *Plukenetia volubilis* sobre na composição lipídica do fígado e tecido adiposo e na histopatologia do tronco aórtico de camundongos da linhagem C57BL/6 (*Black*);
- ✓ Avaliar os efeitos da dieta enriquecida com o óleo das sementes de *Plukenetia volubilis* sobre na composição lipídica do fígado e tecido adiposo e na histopatologia do tronco aórtico de camundongos da linhagem C57BL/6 *knockout* para o gene da apoE (apoE<sup>-/-</sup>).

## 4. ARTIGO I

### **Extração e caracterização do perfil lipídico do óleo das sementes de sacha kiruma (*Plukenetia volubilis* L.) cultivada em Viçosa – MG**

#### **RESUMO**

A sacha kiruma (*Plukenetia volubilis*, L.) é uma planta trepadeira, semilenhosa, perene e nativa do bioma da Amazônia. O óleo extraído das sementes de sacha kiruma é reconhecido como valioso suplemento na alimentação humana, por apresentar alto teor de ácidos graxos insaturados, principalmente da família ômega-3 ( $\omega$ 3). O objetivo deste trabalho foi analisar o perfil lipídico do óleo extraído das sementes de sacha kiruma cultivados sob sol pleno no município de Viçosa (MG), Brasil. A concentração de óleo das sementes, após extração com hexano, foi de 35 à 40% da massa seca das sementes. A análise do perfil lipídico, utilizando cromatografia gasosa, revelou 6,29% de ácidos graxos saturados e elevado teor de poliinsaturados (86,49%), destes 51,18% foram de  $\omega$ 3 e 35,31% de  $\omega$ 6. Os resultados obtidos da concentração de óleo e do perfil de ácidos graxos de sementes de *P. volubilis* foram similares aos relatados na literatura. Contudo, pesquisas devem ser realizadas visando confirmar a viabilidade econômica da produção comercial desse óleo, a seleção dos genótipos mais produtivos e a identificação de técnicas de manejo que potencializem a quantidade e qualidade de ácidos graxos poliinsaturados extraídos de *P. volubilis*.

**Palavras-chave:** Euphorbiaceae; sacha inchi; ácidos graxos essenciais; ômega-3.

## ABSTRACT

Sacha kiruma (*Plukenetia volubilis* L.) is a vine, semihardwood, perennial and native to the Amazon biome. The oil extracted from the seeds of weeding kiruma is recognized as a valuable supplement for human consumption due to its high content of unsaturated fatty acids, especially the omega-3 ( $\omega$ 3). The objective of this study was to analyze the lipid profile of the oil from the seeds in sasha kiruma grown in sunny area Viçosa (MG), Brazil. The concentration of oil seed after extraction with hexane was 35 to 40% of the dry seed. The lipid profile analysis using gas chromatography, showed 6,29% of saturated fatty acids and a high content of polyunsaturated (86,49%), 51,18% of these were 35,31% of  $\omega$ 3 and  $\omega$ 6. The results of the oil concentration and fatty acid profile of seeds of *P. volubilis* were similar to those reported in the literature. However, research should be conducted to confirm the economic feasibility of commercial production of oil, the selection of more productive genotypes and identify management techniques that enhance the quality and quantity of polyunsaturated fatty acids extracted from *P. volubilis*.

**Keywords:** Euphorbiaceae; sacha inchi; essential fatty acids; omega-3.

#### 4.1. INTRODUÇÃO

*Plukenetia volubilis* L. é uma planta trepadeira, perene, e de crescimento rápido (**Figura 2**). Pertence à família Euphorbiaceae, a qual reúne diversas espécies, dentre elas, *Jatropha curcas* (pinhão-manso), *Hevea brasiliensis* (seringueira), *Manihot esculenta* (mandioca) e *Ricinus communis* (mamona), todas de interesse econômico para a população humana (JUDD et al., 2009). Dentre as espécies citadas, destacam-se *J. curcas*, *R. communis* e *P. volubilis* as quais apresentam grande potencial de utilização do óleo extraído de suas sementes. A importância dos estudos com espécies oleaginosas vem crescendo com a gradativa demanda da sociedade na identificação de recursos energéticos alternativos, dentre eles, o biodiesel.

O gênero *Plukenetia* possui plantas dióicas, sem látex, com folhas simples, filotaxia alterna, bordas serrilhadas, glândulas elípticas na base do feixe vascular, nervuras palmadas ou pinadas e estípulas pequenas (GILLESPIE 1993; RAMÍREZ et al., 2000; GILLESPIE 2007). A espécie *P. volubilis* ocorre no norte e oeste da Bacia Amazônica, sendo encontrada em vários países da América Latina, dentre eles, Bolívia, Colômbia, Equador, México, Peru e Venezuela (GILLESPIE, 1993; RAMIREZ, 2000). Por essa razão, recebe diversas denominações, dentre elas, sachá kiruma (THOMAZINI, 2011), sachá inchi, mani del inca, inca peanut, entre outros (GUTIÉRREZ et al., 2011). Segundo registros arqueológicos, sachá kiruma é uma planta de uso milenar na amazônia peruana (CIED, 2007), onde as folhas e sementes são utilizadas na alimentação humana (GUILLÉN et al., 2003).



**Figura 2:** *Plukenetia volubilis*. **A)** Detalhe da parte aérea da planta; **B)** Cápsula seca do fruto tetralocado. **C)** Semente em vista superior; **D)** Fruto do tipo cápsula em forma de estrela, não maduro.

As características morfológicas da sachá kiruma estão apresentadas na **Figura 2**. Uma de suas características mais marcantes é a forma estrelada dos frutos, compostos geralmente de 4 lóculos, de 3 a 5 cm de diâmetros (RUIZ-SOLSOL e MESÉN, 2010). No estado imaturo, os frutos exibem coloração verde e quando maduros, adquirem a cor castanho escuro. As sementes, localizadas dentro dos lóculos, têm forma lenticular, medem de 15 a 25 mm de largura e apresentam alto conteúdo de proteínas, ácidos graxos essenciais ( $\omega 3$  e  $\omega 6$ ) e vitamina E, inclusive em quantidades significativamente maiores do que em outras sementes de oleaginosas, dentre elas: abacate, canola, girassol, linhaça, milho, oliva e soja (HAMAKER et al., 1992; GUILLÉN et al., 2003; FOLLEGATTI ROMERO, 2007; DYER et al., 2008; ROSA, 2010; SCHERR e RIBEIRO, 2010; FANALI et al., 2011).

O óleo extraído das sementes de sachá kiruma, em virtude do alto teor de ácidos graxos poliinsaturados, tem potencial para ser utilizado como matéria prima na produção de cosméticos e fármacos, visto que os ácidos graxos poliinsaturados apresentam efeitos benéficos para a pele, sistemas nervoso e imune e no controle de doenças cardiovasculares (KRIS-ETHERTON et al., 2002; TAPSELL et al., 2004; HUAMÁN et al., 2008; SAREMI e ARORA, 2009; SABATÉ et al., 2010; GARMENDIA et al., 2011).

Para o processo de extração do óleo, diferentes metodologias podem ser utilizadas, tais como: **extração por prensagem**, processo mecânico realizado através de prensa, sendo recomendado para extração de óleos ou gorduras sensíveis a altas temperaturas; **extração por solvente**, inclui basicamente a limpeza da semente, laminação, prensagem, extração com solvente (sendo o mais utilizado o hexano), recuperação do solvente, refino e a estabilização do

óleo, e **extração supercrítica**, que utiliza o poder de solvência de fluidos supercríticos em temperaturas e pressões próximas ao ponto crítico, como por exemplo o dióxido de carbono (FOLLEGATTI ROMERO, 2007). O processo escolhido para o presente estudo foi o de extração por solvente, utilizando hexano.

Follegatti Romero (2007) analisando a composição química de ácidos graxos do óleo de sacha kiruma, obtido por dois processos de extração, supercrítica e através de solvente, não constatou diferença nas características bioquímicas do óleo extraído pelos dois processos. Gomez et al. (1996), Bozan e Temelli (2002) e Nodar et al. (2002) também compararam estes mesmos processos de extração na obtenção de óleo a partir de sementes de linhaça, soja e uva, respectivamente, e não observaram variações significativas na composição de ácidos graxos dos óleos estudados.

Por outro lado Guillén et al. (2003) e Yang e Lallio (apud GUTIÉRREZ et al., 2011) relataram que concentração de gordura nas sementes de *P. volubilis* seria em torno de 35 a 60%, sendo esta variação atribuídas a diferenças presentes entre subespécies, às condições geográficas e climáticas, ao tempo de colheita das sementes e ao método de extração dos lipídeos.

Contudo, devido à escassez de estudos sobre a produção e a qualidade do óleo obtido de sementes de plantas de sacha kiruma cultivadas no Brasil, o objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil lipídico do óleo de sementes colhidas de sacha kiruma cultivados no município de Viçosa (MG).

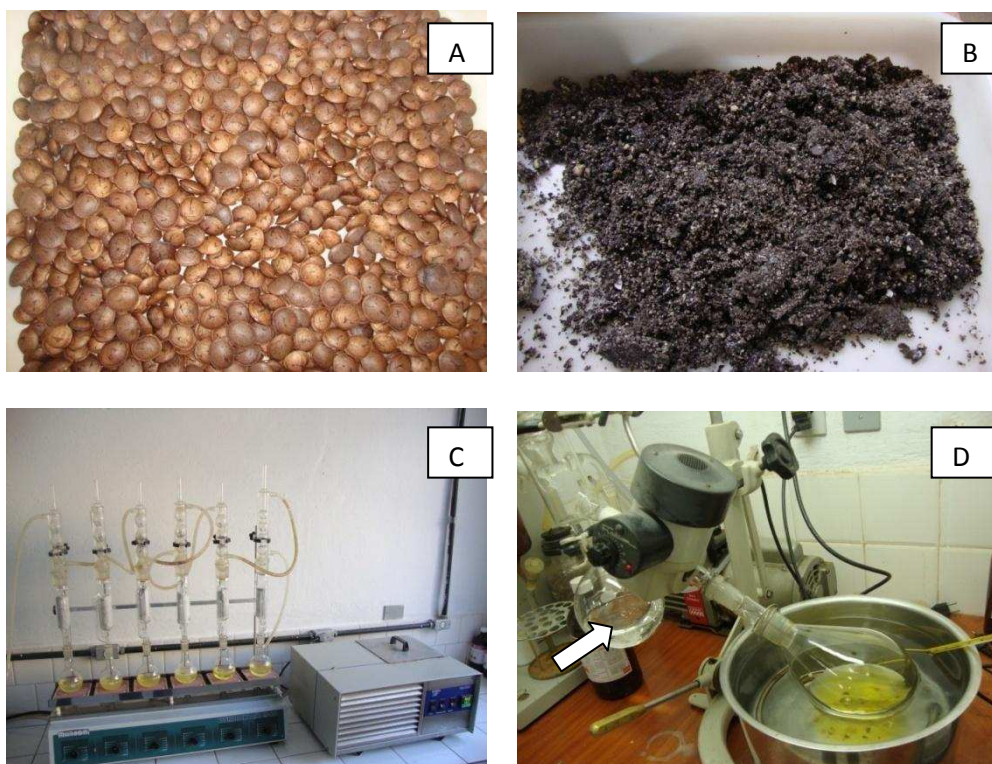
## 4.2. MATERIAL E MÉTODOS

O cultivo de sacha kiruma foi estabelecido em área de solo Argissolo Vermelho Amarelo, sob sol pleno, no Distrito de Silvestre, do município de Viçosa (20° 45' 14" S, 42° 52' 53" O, 648,74 metros acima do nível do mar), cujo clima é caracterizado como tropical de altitude, com temperatura média anual de 20,5°C e precipitação média anual de 97mm. Um espécime testemunha foi depositado no Herbário do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, recebendo o registro VIC 3495.

O óleo de sacha kiruma foi extraído a partir de sementes obtidas das referidas plantas, utilizando a extração por solvente (hexano) no Laboratório de Sementes e no Laboratório de Micorrizas do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. O procedimento metodológico seguido é mostrado na **Figura 3** e descrito abaixo:

- a. **Desumidificação:** as sementes coletadas foram secas em temperatura ambiente por 15 dias e, em seguida, colocadas em estufa com circulação e renovação de ar TE-394/2, Tecnal®, a 45°C por 24 horas;
- b. **Moagem:** As sementes foram moídas em Moinho de Rotor Vertical com facas móveis e fixas;
- c. **Extração do óleo das sementes:** quantidades definidas de sementes moídas (50g ou 100g) foram colocadas em cartuchos de extração, confeccionados com papel de Germinação de Sementes (de 65g), e inseridos no Extrator com Soxhlet's de 500mL. Cada etapa de extração foi realizada sob uma

- temperatura da chapa aquecedora sob os Soxhlet's de 68°C a 70°C e 16°C±1°C da água do condensador, durante 24 horas;
- d. **Filtração:** as misturas obtidas contendo hexano e óleo de *P. volubilis* foram imediatamente filtradas a vácuo por meio da utilização de Bomba de 1,5 HP e papel de filtro com porosidade de 11, a fim de retirar qualquer partícula residual do processo de extração;
- e. **Destilação:** a mistura filtrada foi colocada em um balão de fundo redondo, imersa em banho-maria a 60°C e acoplado ao evaporador rotativo a vácuo, com condensador vertical com temperatura de trabalho a 16°C±0,1°C;
- f. **Purificação:** a amostra de óleo foi transferida a um kitasato em Banho-Maria a 55°C, no qual foi injetado nitrogênio durante 10 minutos, com intuito de retirar qualquer resíduo de hexano e oxigênio presente na amostra;
- g. **Armazenagem:** o óleo puro foi armazenado em frasco âmbar a -20°C.



**Figura 3:** Etapas do processo de extração do óleo das sementes de *Plukenetia volubilis*. (A) Sementes desumidificadas; (B) Sementes após a moagem; (C) Etapa de extração contendo seis Soxhlet's sob a placa aquecedora, acoplados ao condensador; (D) Processo de destilação com evaporador rotativo, contendo óleo (cor amarelo-ouro) no balão em Banho-Maria e hexano purificado (seta). (**Apêndice I**).

Para a avaliação da eficiência do processo de extração do óleo foi utilizada a seguinte relação, em valores percentuais:

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

Utilizou-se da metodologia proposta por FOLCH et al. (1957) e HARTMANN e LAGO (1973) na obtenção dos ésteres de ácidos graxos do óleo para posterior análise em cromatografia gasosa, a fim de determinar o perfil lipídico do óleo das sementes de *P. volubilis*. As determinações foram

realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos e no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

Para a análise estatística foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), complementada pelo teste de comparações múltiplas de *Tukey* ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), tendo sido utilizado o *software SigmaStat 3.5*.

### 4.3. RESULTADOS

#### A) Eficiência do processo de extração do óleo de *Plukenetia volubilis*

Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na eficiência do processo de extração quando se comparou cartuchos com volume de 50 e 100g. As etapas de extração dos cartuchos de 50g apresentaram melhor eficiência, com média de  $40,11 \pm 3,81\%$ , em comparação aos cartuchos com 100g que atingiram a média de  $35,17 \pm 2,13\%$ .

O resultado final indica uma eficiência média total de 38,46% na extração do óleo de *P. volubilis* (Tabela 3).

**Tabela 3:** Resultados da eficiência das etapas de extração do óleo de *P. volubilis*

| Massa dos Cartuchos (g) | n  | Sementes moídas (g) | Óleo bruto extraído (mL) | Eficiência da extração (%) |
|-------------------------|----|---------------------|--------------------------|----------------------------|
| 50                      | 24 | 1139,38             | 457                      | 40,11 <sup>a</sup>         |
| 100                     | 12 | 900                 | 321                      | 35,67 <sup>b</sup>         |
| <b>Total</b>            | -  | <b>2.039,38</b>     | <b>778</b>               | -                          |
| <b>Média</b>            | -  | -                   | -                        | <b>38,46</b>               |

<sup>a,b</sup>  $p < 0,05$  pelo Teste de Tukey.

#### B) Perfil de ácidos graxos do óleo

A composição do óleo de *P. volubilis* está descrita na Tabela 4. O óleo de sacha kiruma possui menor concentração de ácidos graxos saturados (6,29%) e uma maior de poliinsaturados (86,49%), dos quais 51,18% são de  $\omega 3$  e 35,31% de  $\omega 6$ . A relação de  $\omega 6:\omega 3$  foi baixa no óleo de *P. volubilis* (0,68 : 1).

**Tabela 4:** Concentração de ácidos graxos do óleo de sementes de *Plukenetia volubilis* cultivadas em Viçosa, MG, mediante extração por hexano

|                    |                        | <b>ÁCIDOS GRAXOS</b>     |                                  | <b>(%)</b>               |              |
|--------------------|------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------|--------------|
| <b>SATURADOS</b>   |                        |                          | Palmítico (C16:0)                | <b>3,89</b>              |              |
|                    |                        |                          | Heptadecanóico (C17:0)           | <b>0,06</b>              |              |
|                    |                        |                          | Esteárico (C18:0)                | <b>2,27</b>              |              |
|                    |                        |                          | Araquídico (C20:0)               | <b>0,05</b>              |              |
|                    |                        |                          | Behênico (C22:0)                 | <b>0,02</b>              |              |
| <b>INSATURADOS</b> | <b>Monoinsaturados</b> |                          | Palmitoléico (C16:1)             | <b>0,03</b>              |              |
|                    |                        |                          | cis-10-heptadecenóico (C17:1)    | <b>0,02</b>              |              |
|                    |                        |                          | cis-11-Eicosenóico (C20:1)       | <b>0,07</b>              |              |
|                    |                        | <b>ω9</b>                | Oléico (C18:1n9c)                | <b>6,95</b>              |              |
|                    |                        |                          | Elaídico (C18:1n9t)              | <b>0,01</b>              |              |
|                    |                        | <b>Poliinsaturados</b>   | <b>ω3</b>                        | α-Linolênico (C18:3n3)   | <b>51,18</b> |
|                    |                        |                          | <b>ω6</b>                        | Linoléico (C18:2n6c)     | <b>35,09</b> |
|                    |                        |                          |                                  | Linolelaídico (C18:2n6t) | <b>0,04</b>  |
|                    |                        |                          |                                  | γ-Linolênico (C18:3n6)   | <b>0,14</b>  |
|                    |                        |                          | cis-11,14-Eicosadienóico (C20:2) | <b>0,04</b>              |              |
|                    |                        | $\Sigma$ Saturados       |                                  | <b>6,29</b>              |              |
|                    |                        | $\Sigma$ Poliinsaturados |                                  | <b>86,49</b>             |              |
|                    |                        | <b>ω6</b>                |                                  | <b>35,31</b>             |              |
|                    |                        | <b>ω3</b>                |                                  | <b>51,18</b>             |              |
|                    |                        | <b>ω6:ω3</b>             |                                  | <b>0,68 : 1</b>          |              |

#### 4.4. DISCUSSÃO

O volume de sementes, secas e moídas, utilizado no processo de extração do óleo por solvente (50g ou 100g) influenciou na eficiência de extração, pois cartuchos com 50g apresentaram melhor eficiência no processo, em comparação aos de 100g. O teor de óleo obtido das sementes de *Plukenetia volubilis* ( $38,46 \pm 4,02\%$ ) coincidiu com os teores encontrados por outros autores como: Bondioli et al. (2006) que obtiveram  $42,0 \pm 1,1\%$ ; Gutiérrez et al. (2011) com  $41,4\%$ ; Hamaker et al. (1992) e Follegatti Romero (2007) chegaram a aproximadamente  $54\%$  de rendimento no processo de extração. Estas diferenças no teor de óleo das sementes de *P. volubilis* estão relacionadas a características do processo de extração e diferenças morfofisiológicas das plantas produtoras de sementes.

As diferenças no teor de óleo das sementes de *P. volubilis* podem também ser atribuídas às condições climáticas, a características do solo, temperatura do ambiente durante a maturação das sementes, período de colheita das sementes (ÖZCAN, 2010), características de cultivo das plantas, maturidade do fruto, altitude e clima (ORTEGA et al. 2012), o que torna necessário estudos que determinem as melhores condições para o manejo de *P. volubilis*, a fim de potencializar a concentração de óleo em suas sementes.

A produção de óleo de *P. volubilis* pode ser economicamente viável devido à concentração presente em suas sementes (de 38 a 54% de óleo), porcentagem semelhante a espécies que já são comercializadas como *Arachis hypogaea* (amendoim, de 38,4 a 50,7% de óleo), *Brassica napus* (canola de 38 a 44% de óleo) e *Linum usitatissimum* (linhaça com 41% de óleo). Outras características atrativas da espécie estão relacionadas com a facilidade de

manejo, produtividade anual e ao teor de ácidos graxos poliinsaturados presente no óleo (GUTIÉRREZ et al., 2011; ÖZCAN, 2010).

As análises da composição do perfil lipídico de óleos comestíveis indicaram que o óleo com composição adequada para consumo em dietas com baixo teor de gorduras saturadas é o de canola (SCHERR e RIBEIRO, 2010). No entanto, o presente estudo ratifica o que tem sido discutido por outros autores (HAMAKER et al., 1992; FOLLEGATTI ROMERO, 2007; FANALI et al., 2011) a respeito das características bioquímicas ímpares do óleo de *P. volubilis*, sendo ele o que possui a maior concentração de ácidos graxos poliinsaturados 90,79%, sendo 48,62% de  $\omega$ 3, além de apresentar altos teores de tocoferóis (FOLLEGATTI ROMERO, 2007) e baixa relação de  $\omega$ 6: $\omega$ 3, características importantes para a prevenção de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose.

Em face das características apresentadas, torna-se necessário desenvolver pesquisas que confirmem a viabilidade econômica da produção comercial do óleo de *P. volubilis*, além das que visem selecionar os genótipos mais produtivos desta espécie, as técnicas de manejo mais adequadas para potencializar a quantidade e qualidade de ácidos graxos poliinsaturados nas sementes da espécie e verifiquem a segurança da utilização deste óleo na alimentação, por meio de análises dos efeitos biológicos em modelos animais e, posteriormente, na espécie humana.

#### **4.5. CONCLUSÃO**

Com a realização deste trabalho conclui-se que as sementes de espécimes de *P. volubilis* cultivadas no município de Viçosa (MG), apresentaram concentração de óleo e perfil de ácidos graxos similares àqueles já relatados na literatura.

#### 4.6. REFERÊNCIAS

BONDIOLI, P.; DELLA BELLA, L.; RETTKE, P. Alpha linolenic acid rich oils. Composition of *Plukenetia volubilis* (Sacha inchi) oil from Peru. **La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse**, Milano, v. 83, n.3, p.120-123, 2006.

BOZAN, B.; TEMELLI, F. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of flaxseed. **Journal of Oil e Fat Industries**, Illinois, v.79, n.3, p. 231-235, 2002.

**CIED** - Centro de Investigación, Educación y Desarrollo. Cultivo del sachá inchi. **Manual de Capacitación**, 2007. Acesso em 21/11/2012. [Disponível em [http://www.redmujeres.org/biblioteca%20digital/cultivo\\_sacha\\_inchi.pdf](http://www.redmujeres.org/biblioteca%20digital/cultivo_sacha_inchi.pdf)]

DYER, J. M.; STYMNE, S.; GREEN, A. G.; CARLSSON, A. S. High-value oils from plants. **The Plant Journal**, v.54, n.4, p. 640-655, 2008.

FANALI, C.; DUGO, L.; CACCIOLA, F.; BECCARIA, M.; GRASSO, S.; DACHÀ, M.; DUGO P.; MONDELLO, L. Chemical characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. **J Agric Food Chem**, Washington, v. 59, n. 24, p. 1343-1349, 2011.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 226, n.1, p. 497-509, 1957.

FOLLEGATTI ROMERO, L.A. **Extração de óleo de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) com dióxido de carbono**. 2007. 95f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

GARMENDIA, F.; PANDO, R.; RONCEROS, G. Efecto del aceite de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) sobre el perfil lipídico en pacientes com hiperlipoproteinemia. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, Lima, v. 28, n. 4, p. 628-632, 2011.

GILLESPIE, L.J. A Revision of Paletropical *Plukenetia* (Euphorbiaceae) Including Two New Species from Madagascar. **Systematic Botany**, Laramie, v. 32, n. 4, p. 780-802, 2007.

GILLESPIE, L.J. A Synopsis of Neotropical *Plukenetia* (Euphorbiaceae) including two new species. **Systematic Botany**, Laramie, v. 18, n. 4, p. 575-592, 1993.

GOMEZ, A.M.; LOPEZ, C.P.; MARTINEZ de la OSSA, E. Recovery of grape seeds oil by liquid and supercritical carbon dioxide extraction: a comparison with conventional solvent extraction. **The Chemical Engineering Journal**, v. 61, n.3, p. 227-231, 1996.

GUILLÉN, M.D.; RUIZ, A.; CABO, N.; CHIRINOS, R.; PASCUAL, G. Characterization of Sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil by FTIR spectroscopy

and  $^1\text{H}$  NMR. Comparison with linseed oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Illinois, v. 80, n. 8, p. 755-762, 2003.

GUTIÉRREZ, L.F.; ROSADAB, L.M.; JIMÉNEZA, A. Chemical composition of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction. **Grasas y Aceites**, Vitruvio, v. 62, n.1, p. 76-83, 2011.

HAMAKER, B.R.; VALLES, C.; GILMAR, R.; HARDMEIER, R.M.; CLARK, D.; GARCIA, H.H.; GONZALES, A.E.; KOHLSTAD, I.; CASTRO, M. Amino acid and fatty acid profiles of the Inca Peanut (*Plukenetia volubilis* L.). **Cereal Chemistry**, v. 69, p. 461-463, 1992.

HARTMANN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practices**, London, v.22, p. 475-477, 1973.

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. **An Fac Med**, Lima, v. 69, n.4, p. 263-266, 2008.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. **Sistemática Vegetal**: um enfoque filogenético. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 632p.

KRIS-ETHERTON, P.M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. **Circulation**, Dallas, v. 106, p. 2747-2757, 2002.

NODAR, M.D.; GÓMEZ, A.M.; MARTINEZ de la OSSA, E. Characterisation and process development of supercritical fluid extraction of soybean oil. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 6, p. 337-342, 2002.

ORTEGA, A.; VARELA, L.M.; BERNADEZ, B.; LOPEZ, S.; MURIANA, F.J.G.; ABIA, R. Nutrigenomics and atherosclerosis: the postprandial and long-term effects of virgin olive oil ingestion. In: PARTHASARATHY, S. **Atherogenesis**. InTech. Capítulo 7. p.135-160. 2012.

ÖZCAN, M.M. Some Nutritional Characteristics of Kernel and Oil of Peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Journal of Oleo Science**, v.59, n.1, p. 1-5, 2010.

RAMÍREZ, J.J.; GORDILLO, M.M.; DURAN, R.C. El género *Plukenetia* (Euphorbiaceae) em México. **Anales Del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Série Botânica**, v. 71, n. 1, p. 11-18, 2000.

ROSA, D.D. **Lesões pré-neoplásicas, perfil lipídico, marcadores inflamatórios e aspecto histológico intestinal de ratos wistar alimentados com dieta à base de diferentes óleos**. 2010. 127f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2010.

RUIZ-SOLSOL, H.; MESÉN, F. Efecto del ácido indolbutírico y tipo de estaquilla en el enraizamiento de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). **Agronomía Costarricense**, San José, v. 34, n. 2, p. 259-267, 2010.

SABATÉ, J.; ODA, K.; ROS, E. Nut consumption and blood lipid levels: a pooled analysis of 25 intervention trials. **Arch Intern Med**, v. 170, n. 9, p.821-827, 2010.

SAREMI, A.; ARORA, R. The utility of omega-3 fatty acids in cardiovascular disease. **American Journal Therapeutics**, v. 16, n. 5, p. 421-436, 2009.

SCHERR, C.; RIBEIRO, J. P. Gorduras em laticínios, ovos, margarinas e oleos: implicações para a aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n. 1, p. 55-60, 2010.

TAPSELL, L.C.; GILLEN, L.J.; PATCH, C.S.; BATTERHAM, M.; OWEN, A.; BARÉ, M.; KENNEDY, M. Including walnuts in a low-fat/modified-fat diet improves HDL cholesterol-to-total cholesterol ratios in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 12, p. 2777-2783, 2004.

THOMAZINI, B.F. **Avaliação do óleo de sacha kiruma (*Plukenetia volubilis* L.) no duodeno e fígado de camundongos C57BL/6 e apoE<sup>-/-</sup>**. 2011. 71f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2011.

YANG, B.; KALLIO, H. Effects of harvesting time on triacylglycerols and glycerophospholipids of sea buckthorn (*Hippophaë hamnoides* L.) berries of different origins. **J. Food Compos. Anal**, v.15, p. 143–157, 2002, apud GUTIÉRREZ, L.F.; ROSADAB, L.M.; JIMÉNEZA, A. Chemical composition of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction. **Grasas y Aceites**, Vitruvio, v. 62, n. 1, p. 76-83, 2011.

## 5. ARTIGO II

### EFEITO DA DIETA ENRIQUECIDA COM ÓLEO DE *Plukenetia volubilis* NA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DO FÍGADO E TECIDO ADIPOSEO E NA HISTOPATOLOGIA DO TRONCO AÓRTICO DE CAMUNDONGOS DA LINHAGEM C57BL/6

#### RESUMO

O consumo de lipídeos e seus efeitos na saúde tem recebido atenção nas pesquisas, por apresentarem relação direta no surgimento de algumas doenças, como dislipidemias e aterosclerose. Entretanto, alguns estudos têm obtido resultados positivos na utilização de fontes com elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados no controle destas patologias. Vários produtos de origem vegetal podem ser utilizados na obtenção destes ácidos graxos, tais como as sementes e óleos, e a espécie *Plukenetia volubilis* (sacha kiruma) tem despertado interesse na comunidade científica, nesse contexto. Devido à ausência de estudos sobre a utilização do óleo obtido de sementes dessa planta cultivadas no Brasil e a importância na modulação da resposta inflamatória e do sistema imune dos ácidos graxos  $\omega$ 3, realizou-se este trabalho com o objetivo de avaliar os efeitos da dieta enriquecida com o óleo de sacha kiruma no desenvolvimento, no metabolismo lipídico e nas características morfológicas e morfométricas do tronco aórtico de camundongos da linhagem C57BL/6. Foram utilizados 20 camundongos *Mus musculus* da linhagem C57BL/6 (Black) onde os procedimentos experimentais adotados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFV. Para cada grupo de tratamento foi ofertada dieta purificada enriquecida com 7% de óleo de *Plukenetia volubilis* ou óleo de soja comercial durante 90 dias. O perfil lipídico dos óleos das dietas foi determinado por cromatografia gasosa. Para acompanhamento da evolução ponderal de cada grupo, a massa corporal de cada animal foi determinada quinzenalmente. O ganho de massa corporal no grupo foi obtido pela diferença entre a média do peso médio final e inicial dos animais. Ao final do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia através da inalação de dióxido de carbono. Avaliou-se o Metabolismo Lipídico através do exame bioquímico sérico e Colesterol Total. Verificou-se o perfil de ácidos graxos dos órgãos e realizou-se, por fim, os

procedimentos histológicos foram realizados na porção inicial da aorta (raiz), cuja característica estrutural foi a presença da valva aórtica, determinando os seguintes parâmetros: área total da aorta, área da luz e a área da parede da aorta. Concluiu-se que a dieta enriquecida com o óleo de *Plukenetia volubilis*, ofertada a camundongos Black, influencia positivamente: (i) as concentrações de ácidos graxos essenciais ( $\omega 3$  e  $\omega 6$ ) da gordura abdominal e do fígado; (ii) a concentração de PUFA total da gordura abdominal; (iii) a concentração de ácidos graxos poliinsaturados totais do fígado; (iv) a relação de  $\omega 6:\omega 3$ , que é 12,17 vezes menor, na gordura abdominal.

**Palavras-chave:** Euphorbiaceae; ácidos graxos essenciais; perfil lipídico.

## ABSTRACT

The consumption of lipids and their effects on health has received attention in the polls, because they have a direct relationship in the onset of some diseases, such as dyslipidemia and atherosclerosis. However, some studies have obtained positive results in the use of sources with high content of polyunsaturated fatty acids in the control of these diseases. Several plant products can be used to obtain these fatty acids, such as seeds and oils, and the species *Plukenetia volubilis* (sacha kiruma) has aroused interest in the scientific community, in that context. Due to the absence of studies on the use of oil obtained from seeds of this plant grown in Brazil and importance in modulating the inflammatory response and immune  $\omega$ 3 fatty acids, this work was performed in order to assess the effects of diet enriched with oil sacha kiruma development, lipid metabolism and morphological and morphometric characteristics of the aortic trunk mouse strain C57BL/6. We used 20 mice of *Mus musculus* C57BL/6 (Black) where the experimental procedures used in this study were approved by the Research Ethics at UFV. For each treatment group was supplied purified diet supplemented with 7% oil of *Plukenetia volubilis* or commercial soybean oil for 90 days. The lipid profile of the oils of the diets was determined by gas chromatography. For monitoring the weight gain for each group, the body weight of each animal was measured biweekly. The gain in body weight in the group was calculated as the difference between the average final and average initial weight of the animals. At the end of the experiment, animals were euthanized by inhalation of carbon dioxide. We evaluated the Lipid Metabolism by examining serum biochemical and Total Cholesterol. It is the fatty acid profile of organs and held finally, the histological procedures were performed in the initial portion of the aorta (root) whose structural feature is the presence of the aortic valve, determining the following parameters: total area aortic lumen area and the area of the aortic wall. It was concluded that the diet enriched with oil *Plukenetia volubilis*, Black offered to mice, positively influences: (i) the concentrations of essential fatty acids ( $\omega$ 3 and  $\omega$ 6) abdominal fat and liver, (ii) the concentration of PUFA total abdominal fat, (iii) the concentration of total polyunsaturated fatty liver, (iv) the ratio of  $\omega$ 6: $\omega$ 3, which is 12,17 times lower abdominal fat.

**Keywords:** Euphorbiaceae; essential fatty acids, lipid profile.

## 5.1. INTRODUÇÃO

O consumo de lipídeos e seus efeitos na saúde tem recebido atenção nas pesquisas, pois apresenta relação direta no surgimento de algumas doenças, como dislipidemias e aterosclerose (JONES e KUBOW, 2009; GRUNDY, 2009). Alguns estudos têm obtido resultados positivos na utilização de fontes com elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados no controle dos fatores de risco das doenças cardiovasculares, seja diminuindo o risco de arritmias, efeitos antitrombóticos, diminuição da pressão arterial, melhoria da função endotelial, diminuição da concentração de triglicerídeos, ação antiinflamatória e/ou antiaterosclerótica (KRIS-ETHERTON et al., 2002; TAPSELL et al., 2004; HUAMÁN et al., 2008; SAREMI e ARORA, 2009; SABATÉ, 2010; GARMENDIA et al., 2011).

Vários produtos de origem vegetal podem ser utilizados na obtenção destes ácidos graxos poliinsaturados, tais como as sementes e óleos. No entanto, a espécie *Plukenetia volubilis* (sacha inchi, sacha kiruma ou amendoim inca), da família Euphorbiaceae, presente na Floresta Amazônica, tem despertado interesse na comunidade científica. Suas sementes apresentam alto conteúdo de proteínas, ácidos graxos essenciais ( $\omega 3$  e  $\omega 6$ ) e vitamina E, inclusive em quantidades significativamente maiores do que em outras sementes de oleaginosas, dentre elas abacate, canola, girassol, linhaça, milho, oliva e soja (HAMAKER, et al., 1992; GUILLÉN et al., 2003; FOLLEGATTI ROMERO, 2007; DYER, 2008; GORRITI et al., 2010; SCHERR e RIBEIRO, 2010; ROSA, 2010; FANALI et al., 2011; GARMENDIA et al., 2011; GUTIÉRREZ et al., 2011).

Devido à ausência de estudos sobre a utilização do óleo obtido de sementes de plantas de sachá kiruma cultivadas no Brasil e a importância na modulação da resposta inflamatória e do sistema imune dos ácidos graxos  $\omega$ 3, realizou-se este trabalho com o objetivo de avaliar os efeitos da dieta enriquecida com o óleo de sachá kiruma no desenvolvimento, no metabolismo lipídico e nas características morfológicas e morfométricas do tronco aórtico de camundongos da linhagem C57BL/6.

## 5.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1. Animais e Delineamento Experimental

Foram utilizados 20 camundongos *Mus musculus* da linhagem C57BL/6 (Black), de ambos os sexos, todos com 44 dias de idade, massa corporal média de 22,49g e provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Os procedimentos experimentais adotados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFV, ofício nº 63/2010/DVT – UFV, de 11 de agosto de 2010.

Os animais foram separados em quatro grupos que diferiram em relação ao tratamento e/ou sexo (**Tabela 5**). Foram mantidos em gaiolas coletivas (5 animais/gaiola) na Sala de Experimentação II do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde do CCB da UFV, sob condições controladas de umidade, temperatura ( $21^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), fotoperíodo de 12 horas claro/escuro e isolamento acústico.

**Tabela 5:** Caracterização dos grupos experimentais

| Linhagem     | Grupos | Sexo  | Tratamento*                 | Número de Animais <sup>†</sup> |
|--------------|--------|-------|-----------------------------|--------------------------------|
| <b>Black</b> | 1      | Macho | Óleo de <i>P. volubilis</i> | 5                              |
|              | 2      | Fêmea | Óleo de <i>P. volubilis</i> | 5                              |
|              | 3      | Macho | Óleo de Soja                | 5                              |
|              | 4      | Fêmea | Óleo de Soja                | 5                              |

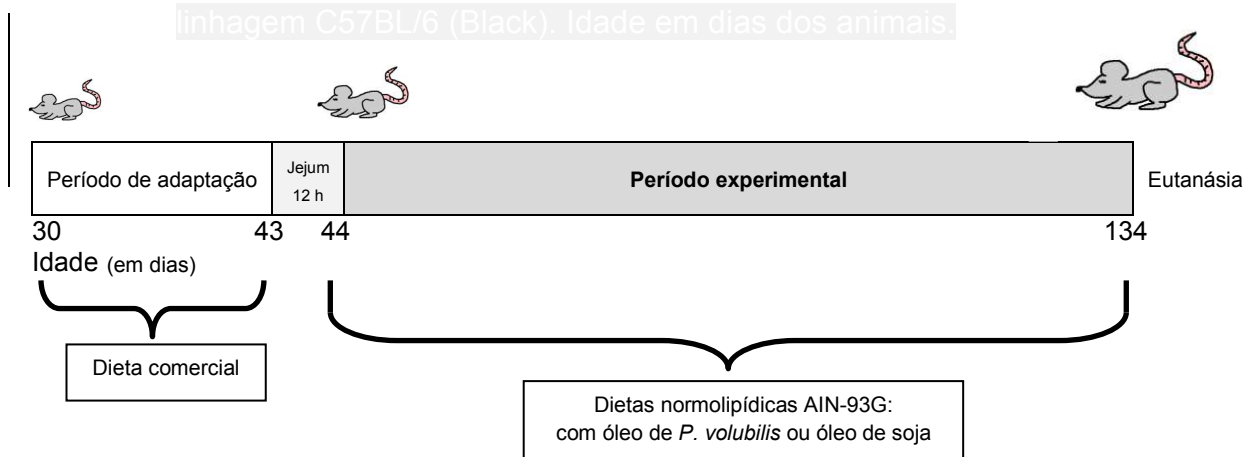
\* Tratamento com óleo de *Plukenetia volubilis* (dieta experimental) ou com óleo de soja (dieta controle);

<sup>†</sup> Número de animais no início da pesquisa.

### 5.2.2. Dietas

Para cada grupo de tratamento foi ofertada dieta purificada enriquecida com 7% de óleo de *Plukenetia volubilis* (de plantas cultivadas em Viçosa – MG) ou óleo de soja comercial (Soya BUNGE®) durante 90 dias (**Figura 4**). Estas foram preparadas de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição para camundongos em crescimento, gestação e lactação, protocolo AIN-93G (REEVES et al., 1993) (**Apêndice II**). O perfil lipídico dos óleos das dietas foi determinado por cromatografia gasosa, utilizando a metodologia de rotina do Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição e Saúde do CCB da UFV (FOLCH et al., 1957; HARTMANN e LAGO, 1973).

Figura 4: Linha do tempo do experimento. Camundongos *Mus musculus* da linhagem C57BL/6 (Black). Idade em dias dos animais.



**Figura 4:** Linha do tempo do experimento. Camundongos *Mus musculus* da linhagem C57BL/6 (Black). Idade em dias dos animais.

### 5.2.3. Consumo alimentar das dietas

Para a quantificação do consumo alimentar, as dietas ofertadas foram pesadas duas vezes na semana, sendo que a diferença da dieta ofertada e o restante não consumido dividido por 5 (número de animais presentes na gaiola) forneceu o consumo da dieta. A média do consumo alimentar por animal ao

longo do experimento foi obtida por meio da média das análises do consumo alimentar dos períodos analisados (n=26).

#### **5.2.4. Evolução Ponderal**

Para acompanhamento da evolução ponderal de cada grupo, a massa corporal de cada animal foi determinada quinzenalmente, utilizando-se balança analítica com duas casas decimais. O ganho de massa corporal no grupo foi obtido pela diferença entre a média do peso médio final e inicial dos animais.

#### **5.2.5. Eutanásia e Coleta de Órgãos**

Ao final do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia através da inalação de dióxido de carbono, conforme Paiva et al. (2005), procedendo-se imediatamente a coleta do sangue e dos órgãos (raiz aórtica e porção ascendente da aorta, fígado e gordura abdominal) segundo Peluzio (2001) e Rosa (2010), no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV (**Apêndice III**). Para determinação da índice hepatossomático, expressa em percentagem, utilizou-se o quociente da massa do órgão multiplicado por 100 com a massa corporal.

#### **5.2.6. Avaliação do Metabolismo Lipídico**

##### **5.2.6.1. Exame bioquímico sérico: Colesterol Total**

O soro dos animais foi obtido de amostras de sangue que foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos, em centrífuga Quimis<sup>®</sup> tendo sido realizado a dosagem de colesterol total pela utilização de kit enzimático colorimétrico da empresa Bioclin<sup>®</sup>–Quibasa Química Básica LTDA–(Colesterol

Monoreagente, código interno K083-2. Registro na ANVISA de número 10269360141). (**Apêndice IV**).

#### **5.2.7.2. Verificação do perfil de ácidos graxos dos órgãos**

A determinação do perfil lipídico das amostras de gordura abdominal e do fígado foi feita por cromatografia gasosa. Inicialmente foi realizada a extração dos lipídios das amostras, saponificação e esterificação, a fim de obter seus ésteres de ácidos graxos para a análise, utilizando a metodologia de rotina do Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição e Saúde do CCB/UFV (FOLCH et al., 1957; HARTMANN, 1973) (**Apêndice V**).

#### **5.2.7. Procedimentos histológicos**

Fragmentos da aorta foram fixados em solução de paraformaldeído-glutaraldeído durante 24 horas (KARNOVSKY, 1965). Em seguida, os fragmentos foram lavados em água destilada e armazenados em frascos contendo álcool 70° até serem processados para inclusão em paraplast. Para a microtomia utilizou-se o micrótomo rotativo *Reichert-Jung 2045 Multicut* (Alemanha), para a obtenção de cortes transversais seriados com 8 µm de espessura. As técnicas de coloração utilizadas foram: Tricromo de Masson (modificado por Mallory) (TOLOSA, 2003), que evidencia a matriz extracelular do tecido conjuntivo e tecido muscular, e Verhoeff (LAP, 2010), para revelação de fibras elásticas (em azul escuro), fibras colágenas (de róseo à vermelho), fibras musculares (em tons amarelados) e núcleos (de preto à azul) (**Apêndice VII**).

A área de estudo da aorta foi a porção inicial (raiz da aorta), cuja característica estrutural foi a presença da valva aórtica.

### 5.2.8. Captura de imagens

Imagens (2048 x 1536 pixels) de uma ou duas secções não consecutivas, com intervalo mínimo de 24  $\mu\text{m}$ , foram obtidas utilizando-se o microscópio de luz (BX-60®, *Olympus*, Tóquio, Japão) com câmara digital de captura (QColor-3®, *Olympus*, Tóquio, Japão) acoplada a um sistema computadorizado (Q-Capture) do Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia Geral/UFV. As imagens digitalizadas foram analisadas por meio do programa *Image Pro-Plus*® versão 4.5 (*Média Cybernetics, Inc. Silver Spring, MD, EUA*).

### 5.2.9. Morfometria da aorta e das lesões ateroscleróticas

Na raiz da aorta foram determinados os seguintes parâmetros: **área total da aorta**, **área da luz** e a **área da parede da aorta**. Para cada animal foram analisadas de 6 a 10 secções, com espaçamento mínimo de 24  $\mu\text{m}$  entre as imagens, tendo sido obtido a média dos parâmetros analisados por indivíduo, conforme protocolo adaptado de Van Vré et al. (2007).

Por animal foram analisadas de 6 à 10 secções com espaçamento mínimo de 24  $\mu\text{m}$  entre as imagens da raiz da aorta, determinando-se o seguinte: **área de lesão aterosclerótica** (em  $\mu\text{m}^2$ ), em uma extensão média de 250-350  $\mu\text{m}$  da raiz da aorta; **número total de lesões ateroscleróticas**, em uma extensão média de 250-350  $\mu\text{m}$  da raiz da aorta; **área total das lesões ateroscleróticas**, em uma extensão de 256  $\mu\text{m}$  da raiz da aorta, modificado de Paigen et al. (1987) e **área das três maiores lesões de cada animal**, em uma extensão média de 250-350  $\mu\text{m}$  da raiz da aorta.

### 5.2.12. Análise estatística

Foi utilizado o *software SigmaStat* 3.5 com nível de significância igual a 95% ( $p < 0,05$ ). Inicialmente foi aplicado o teste de *Kolmogorov-Smirnov* (K-S), para determinar a distribuição das variáveis: (i) variáveis com distribuição normal foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), complementada pelo teste de comparações múltiplas de *Tukey*, quando ( $p < 0,05$ ); (ii) dados sem distribuição normal as médias foram analisadas pelo teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*, complementado pelo teste de *Student-Newman-Keuls*, quando  $p < 0,05$ .

### 5.3. RESULTADOS

#### 5.3.1. Perfil de Ácidos Graxos do Óleo das Dietas

O perfil lipídico dos óleos das dietas do experimento está descrita na **Tabela 6**, destacando-se que óleo de sacha kiruma apresenta alto teor de ácidos graxos poliinsaturados (86,49%), enquanto o óleo de soja apresenta 67,60%.

**Tabela 6:** Concentração de ácidos graxos dos óleos das sementes de *Plukenetia volubilis* e de soja utilizados nas dietas de camundongos Black

|                    |                        | ÁCIDOS GRAXOS            | <i>P. volubilis</i><br>(%)       | Soja*<br>(%)             |                      |       |
|--------------------|------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------|----------------------|-------|
| <b>SATURADOS</b>   |                        | Palmítico (C16:0)        | 3,89                             | 7,7                      |                      |       |
|                    |                        | Heptadecanóico (C17:0)   | 0,06                             | -                        |                      |       |
|                    |                        | Esteárico (C18:0)        | 2,27                             | 3,0                      |                      |       |
|                    |                        | Araquídico (C20:0)       | 0,05                             | -                        |                      |       |
|                    |                        | Behênico (C22:0)         | 0,02                             | 0,3                      |                      |       |
| <b>INSATURADOS</b> | <b>Monoinsaturados</b> |                          | Palmitoléico (C16:1)             | 0,03                     | -                    |       |
|                    |                        |                          | cis-10-heptadecenóico (C17:1)    | 0,02                     | -                    |       |
|                    |                        |                          | cis-11-Eicosenóico (C20:1)       | 0,07                     | -                    |       |
|                    | <b>Poliinsaturados</b> | <b>ω9</b>                |                                  | Oléico (C18:1n9c)        | 6,95                 | 21,3  |
|                    |                        |                          |                                  | Elaídico (C18:1n9t)      | 0,01                 | -     |
|                    |                        | <b>ω3</b>                |                                  | α-Linolênico (C18:3n3)   | 51,18                | 6,9   |
|                    |                        |                          | <b>ω6</b>                        |                          | Linoléico (C18:2n6c) | 35,09 |
|                    |                        |                          |                                  | Linolelaídico (C18:2n6t) | 0,04                 | -     |
|                    |                        |                          |                                  | γ-Linolênico (C18:3n6)   | 0,14                 | -     |
|                    |                        |                          | cis-11,14-Eicosadienóico (C20:2) | 0,04                     | -                    |       |
|                    |                        | <b>Σ Saturados</b>       | 6,29                             | 11,0                     |                      |       |
|                    |                        | <b>Σ Poliinsaturados</b> | 86,49                            | 67,60                    |                      |       |
|                    |                        | <b>ω6</b>                | 35,31                            | 60,7                     |                      |       |
|                    |                        | <b>ω3</b>                | 51,18                            | 6,9                      |                      |       |
|                    |                        | <b>ω6:ω3</b>             | 0,68 : 1                         | 8,8 : 1                  |                      |       |

\* Composição lipídica do óleo de soja–Soja, BUNGE®. Valores apresentados em g/100g (ROSA, 2010).

### 5.3.2. Consumo Alimentar e Desenvolvimento dos Animais

Os resultados do consumo alimentar, massa corporal e da análise da índice hepatossomático dos animais do experimento estão descritos na **Tabela 7**.

**Tabela 7:** Parâmetros de consumo alimentar, massa corporal e do fígado (em grama) de camundongos Black alimentados com ração enriquecida com óleo de *Plukenetia volubilis* ou óleo de soja

| Parâmetro                               | Machos              |                | Fêmeas              |                |
|---|---------------------|----------------|---------------------|----------------|
|   | <i>P. volubilis</i> | Soja           | <i>P. volubilis</i> | Soja           |
| Consumo alimentar médio (g/dia/animal)* | 3,30 ± 0,60 †       | 3,59 ± 0,50 ‡  | 3,18 ± 0,48 †       | 3,19 ± 0,45 †  |
| Massa corporal inicial (g)              | 25,58 ± 1,09 †      | 25,88 ± 3,08 † | 18,93 ± 0,80 ‡      | 19,56 ± 1,15 ‡ |
| Massa corporal final (g)                | 23,55 ± 0,65 †      | 24,85 ± 2,22 † | 18,91 ± 0,45 ‡      | 18,59 ± 1,33 § |
| Massa do Fígado*                        | 0,97 ± 0,07 †       | 1,03 ± 0,09 †  | 0,81 ± 0,04 ‡       | 0,86 ± 0,04 ‡  |
| Índice hepatossomático**                | 4,12 ± 0,19 †       | 4,16 ± 0,30 †  | 4,29 ± 0,19 †‡      | 4,65 ± 0,27 ‡  |

\*Foram realizadas 26 aferições ao longo do experimento.

\*\*Valores expressos em porcentagem relativa da massa do fígado pela massa total do grupo (n=5).

† ‡ § Valores médios seguidos da mesma letra na mesma linha não diferem significativamente entre si (p<0,05) pelo Teste de *Tukey* (massa inicial) ou pelo Teste *Kruskal-Wallis* (quando os valores não apresentaram distribuição normal), complementado com o método *Student-Newman-Keuls* (massa final e consumo alimentar).

#### I – Consumo alimentar dos camundongos

Não houve variação significativa no consumo, entre os sexos, dos animais tratados com dieta contendo óleo de *P. volubilis*. As fêmeas tratadas com dieta com o óleo de *P. volubilis* apresentaram em média menos consumo do que as alimentadas com dieta com óleo de soja. Os camundongos machos tratados com dieta contendo soja apresentaram maior consumo alimentar do que as fêmeas (**Tabela 7**).

## II – Massa corporal dos camundongos

A média da **massa corporal inicial** dos animais apresentou distribuição normal, não variando significativamente entre os tratamentos com *P. volubilis* ou soja ( $p=0,568$ ). Houve variação significativa da massa corporal inicial dos animais entre os sexos ( $p<0,001$ ). O teste de *Tukey* identificou diferença significativa da massa inicial dos animais machos com as fêmeas tratadas com *P. volubilis* ou soja ( $p<0,05$ ). Não há interação estatisticamente significativa entre tratamento e sexo ( $p=0,838$ ) (**Tabela 7**).

A média da **massa corporal final** dos animais, não apresentou distribuição normal. Animais do sexo masculino apresentaram maior média de massa corporal final ( $p<0,05$ ) do que as fêmeas, independente do tratamento *P. volubilis* e/ou soja (**Tabela 7**).

## III – Análise da massa do fígado dos camundongos

Analisando a massa do fígado dos animais, houve diferença significativa entre os sexos, independente do tratamento ( $p<0,05$ ). Para o índice hepatossomático, apenas as fêmeas alimentadas com soja apresentaram maior massa em comparação aos machos ( $p<0,05$ ) (**Tabela 7**).

### 5.3.2. Avaliação do Metabolismo Lipídico

A concentração do colesterol total no soro dos camundongos (média mg/dL  $\pm$  desvio padrão) não variou significativamente ( $p>0,05$ ) nos animais que receberam tratamento com ração contendo óleo de *Plukenetia volubilis* ( $103,46 \pm 17,13$ ) ou óleo de soja ( $116,15 \pm 12,35$ ).

O perfil dos ácidos graxos da gordura abdominal e do fígado dos camundongos tratados com dieta contendo óleo de *P. volubilis* ou óleo de soja está representado na **Tabela 8**. Verificou-se alto teor de ácidos graxos  $\omega$ 3 e baixa relação  $\omega$ 6: $\omega$ 3 na gordura abdominal e no fígado de animais tratados com óleo de *P. volubilis*.

**Tabela 8:** Perfil dos principais ácidos graxos presentes na gordura abdominal e no fígado de camundongos Black alimentados com dieta enriquecida com óleo de *P. volubilis* ou de soja

| Ácidos graxos               |  | Gordura abdominal   |          | Fígado              |          |
|-----------------------------|--|---------------------|----------|---------------------|----------|
|                             |  | <i>P. volubilis</i> | Soja     | <i>P. volubilis</i> | Soja     |
| Saturados                   | <b>C16:0</b><br>Palmítico                        | 17,53 *             | 18,40 *  | 17,51               | 21,37    |
|                             | <b>C18:0</b><br>Esteárico                        | 0,89 †              | 3,28 *‡  | 6,37                | 7,64     |
| Monoinsaturados             | <b>C16:1</b><br>Palmitoléico                     | 5,50                | 5,37     | 2,91                | 1,82     |
|                             | <b>C20:1</b><br>cis-11-Eicosenóico               | 0,34                | 0,47     | 2,14                | 1,10     |
|                             | <b>C18:1 n<sup>9</sup><sub>c</sub></b><br>Oléico | 30,34 †             | 37,89 ‡  | 15,36               | 17,55    |
|                             | <b>Σ MUFA</b>                                    | 36,64               | 44,40    | 21,64               | 21,13    |
| Poliinsaturados             | <b>ω3</b>  | 12,24 *†            | 1,17 ‡   | 17,87 §             | 6,54 //  |
|                             | <b>ω6</b>  | 23,61 *†            | 28,01 ‡  | 24,79 §             | 33,28 // |
|                             | <b>ω6:ω3</b>                                     | 1,95 †              | 23,75 *‡ | 1,40                | 5,10     |
|                             | <b>Σ PUFA</b>                                    | 36,33 *†            | 29,18 *‡ | 42,66               | 39,82    |
| <b>Σ Saturados totais</b>   |  | 19,49               | 22,52 *  | 24,28               | 32,17    |
| <b>Σ Insaturados totais</b> |  | 72,97               | 73,58    | 64,30 §             | 60,95 // |

Valores apresentados de ácidos graxos em g/100g, determinados por cromatografia gasosa;

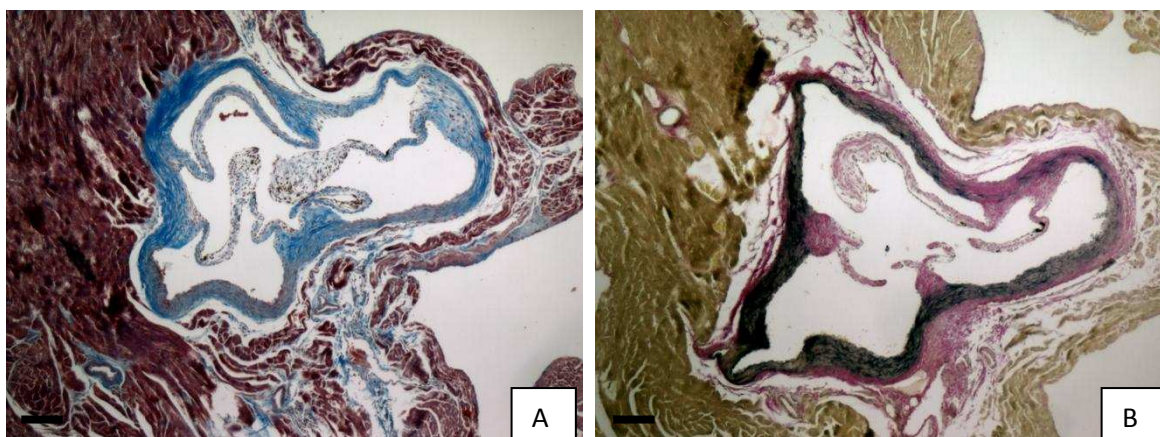
\* Há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os sexos nos tratamentos;

†, ‡ valores diferem significativamente entre si ao nível de 5% de significância;

§, // valores diferem significativamente entre si ao nível de 5% de significância.

### 5.3.3. Morfometria da aorta e das lesões ateroscleróticas

Analisando a estrutura da parede da raiz da aorta, as tûnicas da parede e as valvas aórticas, não foram identificadas alterações morfológicas nem lesões ateroscleróticas, independente do tratamento e sexo **Figura 5**.



**Figura 5:** Fotomicrografias da porção proximal da aorta de camundongos Black tratados com óleo de *Plukenetia volubilis* (A) ou soja (B). Aumento de 40x. Colorações de Tricrômico de Masson (A) e Verhoeff (B). Barra = 50 micrômetros.

As análises morfométricas (**área total da aorta, área da luz e área da parede**), da porção inicial da aorta, foram semelhantes em todos os grupos, independente do sexo e tratamento ( $p > 0,05$ ), conforme **Tabela 9**.

**Tabela 9:** Análises das características morfométricas da aorta proximal de camundongos Black alimentados com dieta enriquecida com óleo de sementes de *Plukenetia volubilis* ou de soja

| Parâmetros *        | Camundongos Black   |                 |
|---------------------|---------------------|-----------------|
|                     | <i>P. volubilis</i> | Soja            |
| Área total da aorta | 915,32 ± 175,71     | 818,03 ± 102,25 |
| Área da luz         | 533,80 ± 193,11     | 427,95 ± 91,63  |
| Área da parede      | 381,53 ± 56,21      | 390,09 ± 32,72  |

\* Valores médios das áreas em  $\mu\text{m}^2 \times 10^3 \pm \text{DP}$  – desvio padrão.  $p > 0,05$ .

#### 5.4. DISCUSSÃO

A análise do perfil dos ácidos graxos do óleo de *Plukenetia volubilis*, utilizado na dieta do experimento, está de acordo com os estudos realizados por Hamaker (1992), Guillén et al. (2003), Follegatti Romero (2007) e Fanali et al. (2011) (**Tabelas 2 e 7**). A concentração dos principais componentes do óleo de *P. volubilis*, o ácido oleico ( $\omega 9$ ),  $\alpha$ -linolênico ( $\omega 3$ ) e o linoleico ( $\omega 6$ ), está de acordo com a literatura consultada, sendo este óleo uma fonte de ácidos graxos poliinsaturados, com altas concentrações de  $\omega 3$  e baixa relação  $\omega 6:\omega 3$ , características importantes para a prevenção e controle de dislipidemias e prevenção de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose.

O consumo alimentar dos camundongos Black, independente do tratamento, foi dentro da faixa de consumo da espécie, conforme descrito por Catão-Dias et al. (2006). Não houve variação significativa no consumo, entre os sexos, dos animais tratados com dieta contendo óleo de *P. volubilis*, contudo estes apresentaram em média menos consumo do que os camundongos alimentados com dieta com óleo de soja (**Tabela 7**).

Houve variação significativa ( $p < 0,05$ ) entre os sexos, independente do tratamento, para massa do fígado dos camundongos Black. Para o índice hepatossomático não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, apenas as fêmeas alimentadas com soja apresentaram maior índice hepatossomático em comparação aos machos ( $p < 0,05$ ) (**Tabela 7**), o que indiretamente corrobora os resultados obtidos por Thomazini (2011), que não verificou qualquer tipo de comprometimento na morfologia do fígado de camundongos Black, tratados com dieta a base de óleo de sacha kiruma ou óleo de soja.

Os lipídios da dieta são armazenados, principalmente, no tecido adiposo e no fígado. Tanto no tecido hepático quanto na gordura abdominal dos animais estudados observou-se maior concentração de ácidos graxos insaturados totais em comparação aos saturados totais, independente do tratamento e sexo ( $p < 0,001$  – **Tabela 8**). Com relação à concentração sanguínea de colesterol total, não houve diferença significativa para os valores entre os grupos experimentais.

Na análise os ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) totais, a diferença entre os tratamentos e sexo não foi expressiva ( $p > 0,05$ ). No entanto, houve diferença significativa entre os tratamentos para a concentração do ácido graxo  $\omega 9$  – oleico – C18:1n<sup>9</sup><sub>c</sub> na gordura abdominal ( $p < 0,05$ ) (**Tabela 8**).

Dentre os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) temos os ácidos graxos  $\omega 3$  e  $\omega 6$ , que desempenham várias funções importantes no organismo, como por exemplo: fonte energética; componentes estruturais das membranas celulares, conferindo fluidez a membrana, participando de processos de difusão de sódio e potássio, receptores de insulina e antígenos; precursores de eicosanoides (prostaglandinas e leucotrienos), que modulam funções cardiovascular, imunológica, reprodutiva e secretora de várias células (JONES e KUBOW, 2009). Entretanto, a deficiência de  $\omega 6$  leva ao aparecimento de anemia, lesões cutâneas, aumento da agregação plaquetária, trombocitopenia, esteatose hepática, retardo na cicatrização e aumento na susceptibilidade a infecções. Já para o  $\omega 3$  ocorre aparecimento de sintomas neurológicos, redução na acuidade visual, lesões na pele, retardo no crescimento e diminuição da capacidade de aprendizado (WAITZBERG e BORGES, 2004).

Os camundongos Black alimentados com dieta contendo o óleo de *P. volubilis* apresentaram maior concentração de PUFA totais e menor relação  $\omega 6:\omega 3$  na gordura abdominal do que os animais que receberam dieta enriquecida com o óleo de soja ( $p < 0,05$  – **Tabela 8**). Já as frações de  $\omega 3$  e  $\omega 6$  variaram sua concentração entre os tratamentos tanto na gordura abdominal quanto no tecido hepático dos camundongos. Os animais tratados com *P. volubilis* apresentaram maior concentração de  $\omega 3$  e um nível menor de  $\omega 6$  na gordura abdominal e no fígado ( $p < 0,05$  – **Tabela 8**).

Os ácidos graxos  $\omega 6$  e  $\omega 3$  utilizam a mesma via metabólica para a produção de eicosanoides pró-inflamatórios (ligados às respostas imunológica e inflamação) e a ingestão elevada de  $\omega 6$  em relação a  $\omega 3$  pode levar ao desenvolvimento de fisiopatologias (WAITZBERG e BORGES, 2004). Contudo, ainda não está claro a faixa adequada da relação entre  $\omega 6:\omega 3$ , pois alguns autores citam menos de 4:1 outros 10:1. No presente experimento, os animais alimentados com *P. volubilis* apresentaram uma relação de  $\omega 6:\omega 3$  na gordura abdominal cerca de 12,17 vezes menor do que os alimentados com soja ( $p < 0,05$  – **Tabela 8**).

Independente do tratamento e sexo dos camundongos Black não foram observadas variações na morfologia e morfometria da parede da raiz da aorta, nem a presença de lesões ateroscleróticas (**Figura 5 e Tabela 9**). Estes resultados eram esperados, uma vez que estes animais não são os modelos para os estudos de desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, mas devido a características de facilidade de manejo e seu porte, tornam-se ótimos animais para avaliações fisiopatológicas.

## 5.5. CONCLUSÃO

A dieta enriquecida com o óleo de *Plukenetia volubilis*, ofertada a camundongos Black, influencia positivamente: (i) as concentrações de ácidos graxos essenciais ( $\omega 3$  e  $\omega 6$ ) da gordura abdominal e do fígado; (ii) a concentração de PUFA total da gordura abdominal; (iii) a concentração de ácidos graxos poliinsaturados totais do fígado; (iv) a relação de  $\omega 6:\omega 3$ , que é 12,17 vezes menor, na gordura abdominal.

## 5.6. REFERÊNCIAS

CATÃO-DIAS, J.L.; CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R. **Tratado de Animais Silvestres**. São Paulo: Editora Roca. 2006. 1376p.

FANALI, C.; DUGO, L.; CACCIOLA, F.; BECCARIA, M; GRASSO, S.; DACHÀ, M.; DUGO P.; MONDELLO, L. Chemical characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. **J Agric Food Chem**. 2011, 59(24): p.1343-1349.

FOLCH J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J Biol Chem**. 1957, 226(1): p:497-509.

FOLLEGATTI ROMERO, L.A. **Extração de óleo de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) com dióxido de carbono**. 2007. 95f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

GARMENDIA, F.; PANDO, R.; RONCEROS, G. Efecto Del aceite de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L) sobre El perfil lipídico en pacientes com hiperlipoproteinemia. **Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica**. 2011, 28(4): 628-632.

GORRITI, A.; ARROYO, J; QUISPE, F.; CISNEROS, B.; CONDORHUAMÁN, M.; ALMORA, Y; CHUMPITAZ, V. Toxicidad oral a 60 días Del aceite de sachá inchi (*Plukenetia volubilis*) y linaza (*Linum usitatissimum* L.) y determinación de La dosis letal 50 en roedores. **Ver. Peru Med. Exp. Salud Publica**. 2010, 27(3): p.353-360.

GRUNDY, S.M. Nutrição no controle dos distúrbios dos lipídeos séricos e das lipoproteínas. In: **Nutrição Moderna na saúde e na doença**. 10<sup>a</sup> ed. Baruerí: Editora Manole. 2009; capítulo 67: p.1157 – 1177.

GUILLÉN, M. D.; RUIZ, A.; CABO, N.; CHIRINOS, R.; PASCUAL, G. Characterization of Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil by FTIR spectroscopy and <sup>1</sup>H NMR. Comparison with linseed oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**. 2003, 80 (8): p.755-762.

GUTIÉRREZ, L.F.; ROSADAB, L.M.; JIMÉNEZA, A. Chemical composition of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction. **Grasas y Aceites**. 2011, 62 (1): p.76-83.

HAMAKER, B.R.; VALLES, C.; GILMAR, R.; HARDMEIER, R.M.; CLARK, D.; GARCIA, H.H.; GONZALES, A.E.; KOHLSTAD, I.; CASTRO, M. Amino acid and fatty acid profiles of the Inca Peanut (*Plukenetia volubilis* L.). **Cereal Chemistry**. 1992, 69: p.461-463.

HARTMANN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab Pratic.** 1973, 22: p.475-477.

JONES, P.J.H. e KUBOW, S. Lipídeos, esteróis e seus metabólitos. In: **Nutrição Moderna na saúde e na doença**. 10ª ed. Barueri: Editora Manole. 2009; capítulo 5: p.100 – 132.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **J Cell Biol.** 1965, 27: p.137-138.

KRIS-ETHERTON, P.M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. **Circulation**.106: p.2747-2757. 2002.

LAP – Laboratório de Anatomia Patológica da UNICAMP. **Tecnica de Verhoeff**. Acessado em 2010: <http://anatpat.unicamp.br/tecnicashistologicas.html#t7a>

PAIGEN, B.; MORROW, A.; HOLMES, P.A.; MITCHELL, D.; WILLIAMS, A. Quantitative assessment of atherosclerosis lesions in mice. **Atherosc.** 1987, 68: p.231-240.

PAIVA, F.P.; MAFILI, V.V.; SANTOS, A.C.S. **Curso de Manipulação de Animais de Laboratório**. Salvador: Fundação Osvaldo Cruz (Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz). 2005. 28p.

PELUZIO, M.C.G. **Redução do desenvolvimento de lesões ateroscleróticas por  $\alpha$ -tocoferol e camundongos com diferentes dietas e em estágios diferentes da lesão. Papel da expressão de MCP-1**. Universidade Federal de Minas Gerais. 2001. Tese de Doutorado. 123p.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutrit.** 1993, 123: p.1939-1951.

ROSA, D.D. **Lesões pré-neoplásicas, perfil lipídico, marcadores inflamatórios e aspecto histológico intestinal de ratos wistar alimentados com dieta à base de diferentes óleos**. Universidade Federal de Viçosa. 2010. Dissertação de Mestrado. 127p.

THOMAZINI, B.F. **Avaliação do óleo de sacha kiruma (*Plukenetia volubilis* L.) no duodeno e fígado de camundongos C57BL/6 e apoE<sup>-/-</sup>**. 2011. 71f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2011.

TOLOSA, E.M.C.; RODRIGUES, C.J.; BEHMER, A.O.; NETO, A.G.F. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. Barueri: Manole, 2003: 331p.

VAN VRÉ, E.A.; VAN BEUSEKOM, H.M.; VRINTS, C.J.; BOSMANS, J.M.; BULT, H.; VAN DER GIESSEN, W.J. Stereology: a simplified and more time-efficient method than planimetry for the quantitative analysis of vascular structures in different models of intimal thickening. **Cardiov Pathol.** 2007, 16(1): p.43-50.

WAITZBERG, D.L. e BORGES, V.C. Gorduras. In: **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica.** São Paulo: Editora Atheneu, 2004: 55-78.

## 6. ARTIGO III

### INFLUÊNCIA DA DIETA ENRIQUECIDA COM ÓLEO DE SACHA KIRUMA (*Plukenetia volubilis* L.) NA ATEROSCLEROSE

#### RESUMO

**Fundamento:** A aterosclerose é uma doença de natureza inflamatória e caracterizada pela formação de lesões nas artérias de grande e médio calibre. Atualmente, procura-se identificar medidas preventivas que possam diminuir a prevalência da aterosclerose, e dentre elas, está o consumo de ácidos graxos poliinsaturados, principalmente da família  $\omega 3$  por suas propriedades antiinflamatórias. Nesse sentido, o óleo de sacha kiruma (*Plukenetia volubilis*) se destaca pelo elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados (86,49%), dos quais, pelo menos 51,18% pertencem à família  $\omega 3$ .

**Objetivo:** Avaliar os efeitos da dieta enriquecida com óleo de sementes de sacha kiruma na aterosclerose de camundongos apoE<sup>-/-</sup>.

**Métodos:** Animais com 44 dias de idade (n=20) receberam dieta enriquecida com óleo de *P. volubilis* ou com óleo de soja (7%/AIN-93G), por 90 dias. Avaliou-se o consumo alimentar, a massa corporal, o metabolismo lipídico e características quantitativas e qualitativas das lesões ateroscleróticas da aorta.

**Resultados:** Os camundongos que receberam dieta contendo o óleo de sacha kiruma apresentaram maior consumo; maior concentração de ácidos graxos  $\omega 3$  e  $\omega 6$  na gordura abdominal e no fígado e melhor relação de  $\omega 6:\omega 3$ ; menor número de lesões ateroscleróticas na porção ascendente da aorta e ausência de lesões terminais e avançadas, respectivamente, na porção proximal e ascendente da aorta.

**Conclusão:** Os animais tratados com óleo de sacha kiruma tiveram maior acúmulo de ácidos graxos  $\omega 3$  na gordura abdominal e no fígado, o que pode ter influenciado no menor número de lesões ateroscleróticas e a não ocorrência de lesões avançadas e terminais na região proximal e ascendente da aorta, respectivamente.

**Descritores:** Euphorbiaceae, sacha inchi, ácidos graxos essenciais, ômega-3.

## ABSTRACT

**Background:** Atherosclerosis is an inflammatory disease in nature and characterized by the formation of lesions in the arteries of large and medium caliber. Currently, seek to identify preventive measures that can reduce the prevalence of atherosclerosis, and among them is the consumption of polyunsaturated fatty acids, especially the omega-3 ( $\omega$ 3) for its anti-inflammatory properties. In this sense, the oil sacha kiruma (*Plukenetia volubilis*) stands out for the high content of polyunsaturated fatty acids (86,49%), of which at least 51,18% belong to the family  $\omega$ 3.

**Objective:** To evaluate the effects of diet enriched with seed oil sacha kiruma of atherosclerosis in mouse apoE<sup>-/-</sup>.

**Methods:** Animals at 44 days of age (n = 20) received a diet enriched with *P. volubilis* oil or soybean oil (7%/AIN-93G), for 90 days. We evaluated food intake, body weight, lipid metabolism and quantitative and qualitative characteristics of atherosclerotic lesions of the aorta.

**Results:** The mice that received a diet containing oil sacha kiruma showed higher consumption, higher concentration of  $\omega$ 3 and  $\omega$ 6 fatty acids in the liver and abdominal fat and better relationship  $\omega$ 6: $\omega$ 3; fewer atherosclerotic lesions in the ascending aorta and no lesions and advanced terminals, respectively, and the proximal portion of the ascending aorta.

**Conclusion:** The animals treated with oil sacha kiruma had greater accumulation of  $\omega$ 3 fatty acids in abdominal fat and liver, which may have influenced the fewer atherosclerotic lesions and the occurrence of non-terminals and advanced lesions in the proximal and ascending aorta, respectively.

**Descriptors:** Euphorbiaceae, sacha inchi, essential fatty acids, omega-3.

## 6.1. INTRODUÇÃO

Uma das preocupações atuais em saúde pública é a elevada mortalidade causada por doenças cardiovasculares, dentre elas, a aterosclerose, doença de natureza inflamatória, que consiste na formação progressiva de ateromas ou lesões na túnica íntima de artérias de grande e médio calibre. Estas lesões se caracterizam pelo acúmulo de lipídios, células inflamatórias, matriz extracelular e células musculares lisas<sup>1-3</sup>.

Diversos fatores podem favorecer a aterogênese, como o histórico familiar de enfermidades metabólicas como diabetes e dislipidemias, sedentarismo, dieta hiperlipídica e elevado consumo de carboidratos<sup>4</sup>. Dentre as medidas preventivas para a aterosclerose estão uma dieta com baixo teor de gordura saturada e colesterol e atividade física regular<sup>5</sup>. Também se recomenda o consumo de alimentos ricos em antioxidantes e ácidos graxos essenciais (AGE), como pescado, linhaça, castanha, nozes e azeite de oliva.

No grupo dos AGE ou ácidos graxos poliinsaturados, os ácidos  $\omega$ 3 têm sido objeto de pesquisa, pois estão relacionados, no organismo humano, à produção de eicosanóides, substâncias que podem inibir a síntese de mediadores inflamatórios derivados do ácido araquidônico. Estudos têm evidenciado que a concentração de ácidos graxos essenciais no plasma é modulada pela ingestão dietética e que alimentos influenciam diretamente nas propriedades de regulação exercidas pelos AGE como a síntese de eicosanóides, liberação de citocinas e funções de receptores de membrana, particularmente no recrutamento de leucócitos<sup>6,7</sup>. Dentro desse contexto, outra fonte alternativa de ácidos graxos essenciais é o óleo extraído das sementes de sacha kiruma (*Plukenetia volubilis* Linneo), uma espécie nativa da Floresta

Amazônica e ainda pouco conhecida no Brasil. Vários estudos demonstram que o óleo de sacha kiruma tem 91,6% de ácidos graxos insaturados<sup>8-12</sup>.

O camundongo *knock out* para o gene da apoproteína-E (apoE<sup>-/-</sup>) é um dos modelos mais utilizados em pesquisas do desenvolvimento espontâneo de lesões ateroscleróticas<sup>9</sup>. E considerando a importância da família  $\omega$ 3 na modulação da resposta inflamatória e do sistema imune, realizou-se este trabalho com o objetivo de determinar os efeitos da dieta enriquecida com o óleo de sacha kiruma no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em camundongos apoE<sup>-/-</sup>.

## 6.2. MÉTODOS

### 6.2.1. Animais e Delineamento Experimental

Foram utilizados 20 camundongos *Mus musculus knock out* para o gene da apoE<sup>-/-</sup>, todos com 44 dias de idade, massa corporal média de 19,22g e de ambos os sexos, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Os procedimentos experimentais adotados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFV, ofício nº 63/2010/DVT–UFV, de 11 de agosto de 2010.

Os animais foram separados em quatro grupos experimentais que diferiram em relação ao tratamento e/ou sexo (**Tabela 10**). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (5 animais/gaiola) na Sala de Experimentação II do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde do CCB da UFV, sob condições controladas de umidade, temperatura (21°C±1°C), fotoperíodo de 12 horas claro/escuro e isolamento acústico.

**Tabela 10:** Caracterização dos grupos experimentais

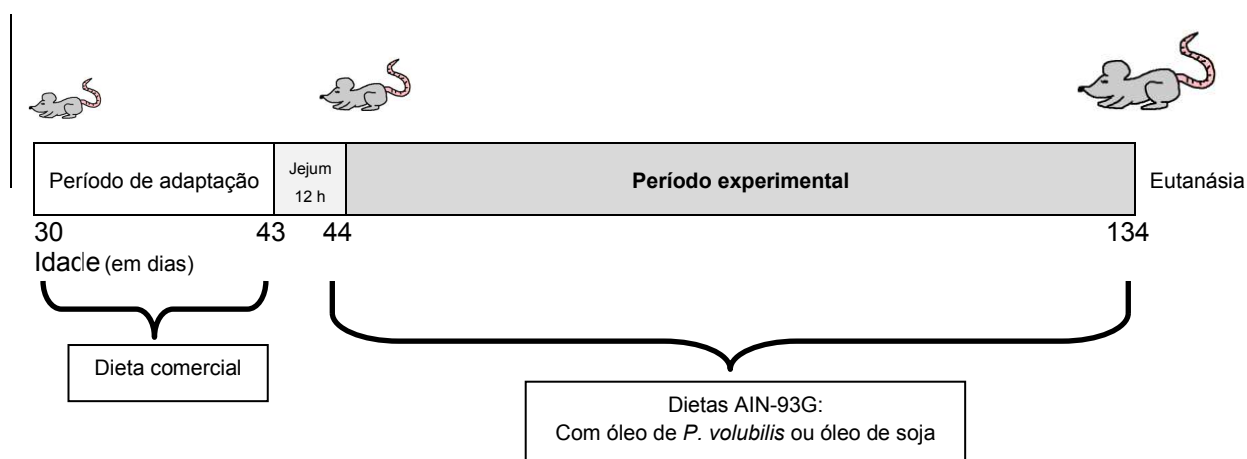
| Linagem             | Grupos | Sexo  | Tratamento*          | Número de Animais <sup>†</sup> |
|---------------------|--------|-------|----------------------|--------------------------------|
| apoE <sup>-/-</sup> | 1      | Macho | Óleo de Sacha kiruma | 5                              |
|                     | 2      | Fêmea | Óleo de Sacha kiruma | 5                              |
|                     | 3      | Macho | Óleo de Soja         | 5                              |
|                     | 4      | Fêmea | Óleo de Soja         | 5                              |

\* Tratamento com óleo de *Plukenetia volubilis* (dieta experimental) ou com óleo de soja (dieta controle);

<sup>†</sup> Número de animais no início da pesquisa.

## 6.2.2. Dietas

Para cada grupo de tratamento foi ofertada dieta purificada enriquecida com 7% de óleo de *Plukenetia volubilis* (de plantas cultivadas em Viçosa – MG) ou óleo de soja comercial (Soya BUNGE®) durante 90 dias (**Figura 6**). Estas foram preparadas de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição para camundongos em crescimento, gestação e lactação, protocolo AIN-93G<sup>13</sup> (**Apêndice II**). O perfil lipídico dos óleos das dietas foi determinado por cromatografia gasosa, utilizando a metodologia de rotina do Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição e Saúde do CCB da UFV<sup>14,15</sup>.



**Figura 6:** Linha do tempo do experimento. Camundongos *Mus musculus* da *knock out* para o gene da apoE<sup>-/-</sup>. Idade em dias dos animais.

## 6.2.3. Consumo Alimentar

Para a quantificação do consumo alimentar, as dietas ofertadas eram pesadas, sendo que a diferença da dieta ofertada e o restante não consumido dividido por 5 (número de animais presentes na gaiola) forneceu o consumo da dieta. A média do consumo alimentar por animal ao longo do experimento foi

obtida por meio da média das análises do consumo alimentar dos períodos analisados (n=26).

#### **6.2.4. Evolução Ponderal**

Para acompanhamento da evolução ponderal de cada grupo, a massa corporal de cada animal foi determinada quinzenalmente, utilizando-se balança analítica com duas casas decimais. O ganho de massa corporal no grupo foi obtido pela diferença entre a média da massa média final e inicial dos animais.

#### **6.2.5. Eutanásia e Coleta de Órgãos**

Ao final do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia através da inalação de dióxido de carbono, conforme Paiva e cols.<sup>16</sup>, procedendo-se imediatamente a coleta do sangue e dos órgãos (raiz aórtica e porção ascendente da aorta, fígado e gordura abdominal) segundo Peluzio (2001) e Rosa (2010), no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV (**Apêndice III**). Para determinação da índice hepatossomático, expressa em percentagem, utilizou-se o quociente da massa do órgão multiplicado por 100 e dividido pela massa corporal.

#### **6.2.6. Avaliação do Metabolismo Lipídico**

##### **6.2.6.1. Exame bioquímico sérico: Colesterol Total**

O soro dos animais foi obtido de amostras de sangue que foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos, em centrífuga Quimis<sup>®</sup> tendo sido realizado a dosagem de colesterol total pela utilização de kit enzimático colorimétrico da empresa Bioclin<sup>®</sup>–Quibasa Química Básica LTDA–(Colesterol

Monoreagente, código interno K083-2. Registro na ANVISA de número 10269360141) (**Apêndice IV**).

#### **6.2.6.2. Verificação do perfil de ácidos graxos dos órgãos**

A determinação do perfil lipídico das amostras de gordura abdominal e do fígado foi feita por cromatografia gasosa. Inicialmente foi realizada a extração dos lipídios das amostras, saponificação e esterificação, a fim de obter seus ésteres de ácidos graxos para a análise, utilizando a metodologia de rotina do Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição e Saúde do CCB da UFV<sup>14,15</sup> (**Apêndice V**).

#### **6.2.7. Procedimentos Histológicos**

Fragmentos da aorta foram fixados em solução de paraformaldeído-glutaraldeído<sup>17</sup> durante 24 horas. Em seguida, os fragmentos foram lavados em água destilada e armazenados em frascos contendo álcool 70° até serem processados para inclusão em paraplast. Para a microtomia utilizou-se o micrótomo rotativo *Reichert-Jung 2045 Multicut* (Alemanha), para a obtenção de cortes transversais seriados com 8 µm de espessura. As técnicas de coloração utilizadas foram: Tricromo de Masson (modificado por Mallory)<sup>18</sup>, que evidencia a matriz extracelular do tecido conjuntivo e tecido muscular, e Verhoeff<sup>19</sup>, para revelação de fibras elásticas (em azul escuro), fibras colágenas (de róseo à vermelho), fibras musculares (em tons amarelados) e núcleos (de preto à azul) (**Apêndice VII**). Foram identificadas duas áreas de estudo da aorta, separadas entre si, por um espaçamento equivalente a 240 µm: (i) porção inicial (presença da valva aórtica); (ii) porção ascendente (ausência da valva aórtica).

### 6.2.8. Captura de Imagens

Imagens (2048 x 1536 pixels) de uma ou duas secções não consecutivas, com intervalo mínimo de 24  $\mu\text{m}$ , foram obtidas utilizando-se o microscópio de luz (BX-60®, *Olympus*, Tóquio, Japão) com câmara digital de captura (QColor-3®, *Olympus*, Tóquio, Japão) acoplada a um sistema computadorizado (Q-Capture) do Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia Geral/UFV. As imagens digitalizadas foram analisadas por meio do programa *Image Pro-Plus*® versão 4.5 (*Média Cybernetics, Inc. Silver Spring, MD, EUA*).

### 6.2.9. Morfometria da aorta e das lesões ateroscleróticas

Nas duas regiões da aorta, porção inicial e ascendente, foram determinados os seguintes parâmetros: **área total da aorta**, **área da luz** e a **área da parede da aorta** das regiões de estudo. Para cada animal e para cada área de estudo, foram analisadas de 6 a 10 secções, com espaçamento mínimo de 24  $\mu\text{m}$  entre as imagens, tendo sido obtido a média dos parâmetros analisados por indivíduo, conforme protocolo adaptado de Van Vré e cols.<sup>20</sup>.

Por animal e em cada região estudada da aorta, foram analisadas de 6 à 10 secções, com espaçamento mínimo de 24  $\mu\text{m}$  entre as imagens, determinando-se o seguinte: **área de lesão aterosclerótica** (em  $\mu\text{m}^2$ ), em uma extensão média de 250-350  $\mu\text{m}$  de cada região da aorta; **área total das lesões ateroscleróticas**, em uma extensão de 256 $\mu\text{m}$  de cada região da aorta, modificado de Paigen e cols.<sup>21</sup>; **área média das três maiores lesões de cada animal**, em uma extensão média de 250-350  $\mu\text{m}$  de cada região da aorta; **número total de lesões ateroscleróticas**, em uma extensão média de 250-350  $\mu\text{m}$  de cada região da aorta. Além disso, foi determinado o tipo histopatológico

de cada lesão, de acordo com a classificação proposta pelo Comitê de Lesões Vasculares do Conselho de Aterosclerose da Associação Americana de Saúde<sup>22</sup> (Tabela11).

**Tabela 11:** Tabela utilizada para as análises de classificação quanto à patogênese e ao tipo de lesão aterosclerótica presente nas secções da aorta dos animais do experimento. Adaptação de Stary (2000)<sup>22</sup>

| Patogênese                | Tipo de Lesão | Característica histopatológica principal   |
|---------------------------|---------------|--|
| <b>Lesões Precursoras</b> | I             | Presença de células espumosas isoladas.  |
|                           | II            | Presença de células espumosas formando camadas.  |
|                           | III           | Presença de colesterol na matriz extracelular da túnica íntima da artéria.   |
| <b>Lesões Avançadas</b>   | IV            | Presença de um ou mais núcleo lipídico (ateroma) e células inflamatórias em maior quantidade.  |
|                           | V             | Presença de um ou mais ateromas envolto(s) por uma capa fibrosa (fibroateroma).  |
|                           | VI            | Presença de um ou mais ateroma ou fibroateroma apresentando: (i) ruptura de superfície; (ii) hemorragia e/ou hematoma; (iii) trombo. |
| <b>Lesões Terminais</b>   | VII           | Presença de um ou mais ateroma ou fibroateroma com áreas de calcificação.  |
|                           | VIII          | Presença de grande acúmulo de tecido conjuntivo fibroso e ateroma ausente ou reduzido.   |

#### 6.2.10. Análise Estatística

Foi utilizado o *software SigmaStat* 3.5 com nível de significância igual a 95%, com o valor de  $p < 0,05$ . Inicialmente foi aplicado o teste de *Kolmogorov-Smirnov* (K-S), para determinar a distribuição das variáveis: (i) variáveis com distribuição normal foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA),

complementada pelo teste de comparações múltiplas de *Tukey*, quando ( $p < 0,05$ ); (ii) dados sem distribuição normal as médias foram analisadas pelo teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*, complementado pelo teste de *Student-Newman-Keuls*, quando ( $p < 0,05$ ).

## 6.3. RESULTADOS

### 6.3.1. Perfil de Ácidos Graxos do Óleo das Dietas

O perfil lipídico dos óleos das dietas do experimento está descrita na **Tabela 12**, destacando-se que óleo de sacha kiruma apresenta alto teor de ácidos graxos poliinsaturados (86,49%), enquanto o óleo de soja apresenta 67,60%.

**Tabela 12:** Concentração de ácidos graxos dos óleos das sementes de *P. volubilis* e de soja utilizados nas dietas de camundongos apoE<sup>-/-</sup>

|                    |                        | ÁCIDOS GRAXOS            | Sacha kiruma (%)                 | Soja* (%)    |              |
|--------------------|------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------|--------------|
| <b>SATURADOS</b>   |                        | Palmítico (C16:0)        | <b>3,89</b>                      | <b>7,7</b>   |              |
|                    |                        | Heptadecanóico (C17:0)   | <b>0,06</b>                      | -            |              |
|                    |                        | Esteárico (C18:0)        | <b>2,27</b>                      | <b>3,0</b>   |              |
|                    |                        | Araquídico (C20:0)       | <b>0,05</b>                      | -            |              |
|                    |                        | Behênico (C22:0)         | <b>0,02</b>                      | <b>0,3</b>   |              |
| <b>INSATURADOS</b> | <b>Monoinsaturados</b> |                          | Palmitoléico (C16:1)             | <b>0,03</b>  | -            |
|                    |                        |                          | cis-10-heptadecenóico (C17:1)    | <b>0,02</b>  | -            |
|                    |                        |                          | cis-11-Eicosenóico (C20:1)       | <b>0,07</b>  | -            |
|                    |                        | <b>ω9</b>                | Oléico (C18:1n9c)                | <b>6,95</b>  | <b>21,3</b>  |
|                    |                        |                          | Elaídico (C18:1n9t)              | <b>0,01</b>  | -            |
|                    | <b>Poliinsaturados</b> | <b>ω3</b>                | α-Linolênico (C18:3n3)           | <b>51,18</b> | <b>6,9</b>   |
|                    |                        | <b>ω6</b>                | Linoléico (C18:2n6c)             | <b>35,09</b> | <b>60,7</b>  |
|                    |                        |                          | Linolelaídico (C18:2n6t)         | <b>0,04</b>  | -            |
|                    |                        |                          | γ-Linolênico (C18:3n6)           | <b>0,14</b>  | -            |
|                    |                        |                          | cis-11,14-Eicosadienóico (C20:2) | <b>0,04</b>  | -            |
|                    |                        | <b>Σ Saturados</b>       |                                  | <b>6,29</b>  | <b>11,0</b>  |
|                    |                        | <b>Σ Poliinsaturados</b> |                                  | <b>86,49</b> | <b>67,60</b> |
|                    |                        | <b>ω6</b>                | <b>35,31</b>                     | <b>60,7</b>  |              |
|                    | <b>ω3</b>              | <b>51,18</b>             | <b>6,9</b>                       |              |              |
|                    | <b>ω6:ω3</b>           | <b>0,68 : 1</b>          | <b>8,8 : 1</b>                   |              |              |

\* Composição lipídica do óleo de soja—Soja, BUNGE®. Valores apresentados em g/100g<sup>23</sup>.

### 6.3.2. Consumo Alimentar e Desenvolvimento dos Animais

Os resultados do consumo alimentar, massa corporal e da análise da índice hepatossomático dos animais do experimento estão descritos na **Tabela 13**. Os animais tratados com dieta enriquecida com óleo de sacha kiruma apresentaram maior consumo alimentar, ainda que isso não repercutisse em maior ganho de massa corporal ao final do experimento.

**Tabela 13:** Parâmetros de consumo alimentar, massa corporal e massa do fígado de camundongos apoE<sup>-/-</sup>, alimentados com ração enriquecida com óleo de *P. volubilis* ou de soja

| Parâmetro *                        | Machos apoE <sup>-/-</sup> |                | Fêmeas apoE <sup>-/-</sup> |                |
|------------------------------------|----------------------------|----------------|----------------------------|----------------|
|                                    | Sacha kiruma               | Soja           | Sacha kiruma               | Soja           |
| Consumo alimentar (g/dia/animal) † | 3,89 ± 0,44 ‡              | 3,56 ± 0,50 §  | 3,65 ± 0,38 //             | 3,55 ± 0,41 §  |
| Massa inicial (g)                  | 20,52 ± 2,14 ‡             | 20,79 ± 2,33 ‡ | 18,75 ± 1,35 ‡§            | 16,81 ± 1,84 § |
| Massa final (g)                    | 25,56 ± 2,65 ‡             | 23,42 ± 1,60 ‡ | 19,71 ± 1,14 §             | 19,15 ± 0,86 § |
| Massa do Fígado (g)                | 1,20 ± 0,11 ‡              | 1,02 ± 0,16 ‡  | 1,05 ± 0,14 ‡              | 0,90 ± 0,26 ‡  |
| Índice hepatossomático (g)         | 4,69 ± 0,15 ‡              | 4,36 ± 0,54 ‡  | 5,33 ± 0,47 ‡              | 4,70 ± 1,27 ‡  |

\* Valores expressos em média±desvio padrão;

† Foram realizadas 26 aferições ao longo do experimento;

‡,§,// Valores médios seguidos do mesmo marcador, na mesma linha, não diferem significativamente entre si (p<0,05).

### 6.3.3. Avaliação do Metabolismo Lipídico

A concentração de colesterol total no soro de camundongos apoE<sup>-/-</sup> (média mg/dL ± desvio padrão) não variou significativamente (p>0,05) dos animais tratados com ração enriquecida com óleo de *Plukenetia volubilis* (261,53 ± 53,69) ou óleo de soja (315,79 ± 57,62).

O perfil de ácidos graxos da gordura abdominal e do fígado de camundongos apoE<sup>-/-</sup>, tratados com dieta contendo óleo de *Plukenetia volubilis*

ou soja está representado na **Tabela 14**, na qual se verifica um alto teor de ácidos graxos  $\omega 3$  e uma baixa relação  $\omega 6:\omega 3$  na gordura abdominal e no fígado de animais tratados com óleo de sacha kiruma.

**Tabela 14:** Perfil de ácidos graxos na gordura abdominal e no fígado de camundongos apoE<sup>-/-</sup> alimentados com dieta enriquecida com óleo de *P. volubilis* ou de soja

| Ácidos graxos               |   | Gordura abdominal |                   | Fígado            |                    |
|-----------------------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
|                             |   | Sacha kiruma      | Soja              | Sacha kiruma      | Soja               |
| Saturados                   | <b>C16:0</b><br>Palmítico                       | 19,6              | 17,3              | 19,6              | 18,8               |
|                             | <b>C18:0</b><br>Esteárico                       | 2,3*              | 2,7*              | 5,6               | 4,2                |
| Monoinsaturados             | <b>C16:1</b><br>Palmitoléico                    | 5,8               | 4,2               | 2,9               | 3,1                |
|                             | <b>C18:1n<sup>9</sup><sub>c</sub></b><br>Oléico | 31,3              | 33,4*             | 19,6*             | 24,0*              |
| <b>Σ MUFA*</b>              |   | 37,9              | 39,2              | 23,1 <sup>§</sup> | 30,0 <sup>//</sup> |
| Poliinsaturados             | <b>ω3</b>                                       | 11,7 <sup>†</sup> | 1,5 <sup>‡</sup>  | 18,8 <sup>§</sup> | 4,5 <sup>//</sup>  |
|                             | <b>ω6</b>                                       | 25,3 <sup>†</sup> | 31,0 <sup>‡</sup> | 30,4 <sup>§</sup> | 36,8 <sup>//</sup> |
|                             | <b>ω6:ω3</b>                                    | 2,2 : 1           | 21,5 : 1          | 1,6 : 1           | 16,5 : 1           |
| <b>Σ PUFA</b>               |   | 37,0 <sup>†</sup> | 32,5 <sup>‡</sup> | 49,2 <sup>§</sup> | 41,3 <sup>//</sup> |
| <b>Σ Saturados totais</b>   |   | 23,7              | 21,4              | 25,6              | 23,5               |
| <b>Σ Insaturados totais</b> |   | 74,9              | 71,7              | 49,2              | 41,3               |

Valores apresentados de ácidos graxos em g/100g, encontrados pela cromatografia gasosa;

\* Há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os sexos nos tratamentos;

†, ‡ valores diferem significativamente entre si ao nível de 5% de significância;

§, // valores diferem significativamente entre si ao nível de 5% de significância.

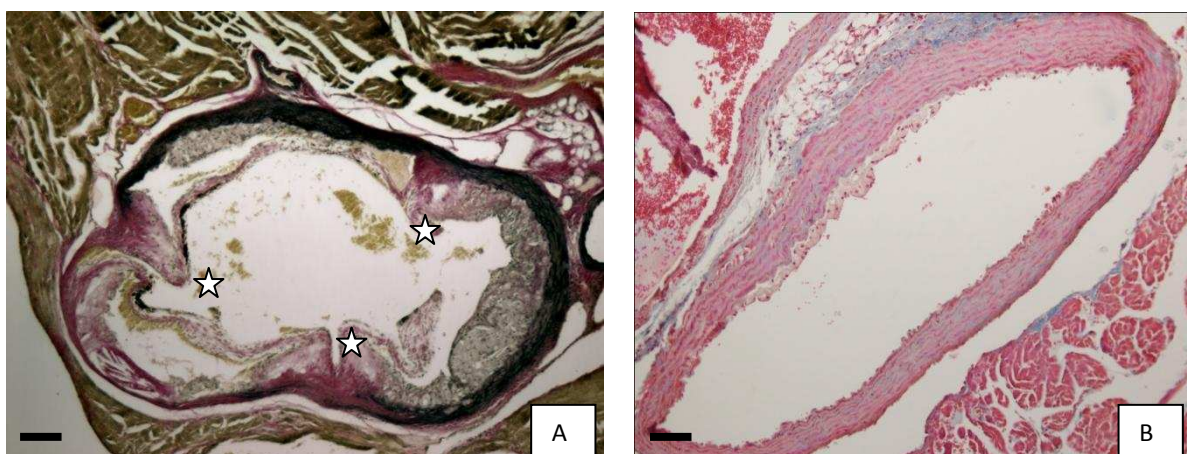
### 6.3.4. Morfometria da aorta e das lesões ateroscleróticas

A análise das características morfológicas e morfométricas (área total da aorta, área da luz e área da parede), das regiões estudadas da aorta, foram semelhantes em todos os grupos, independente do sexo e tratamento ( $p > 0,05$ ), conforme **Tabela 15 e Figura 7**.

**Tabela 15:** Morfometria das regiões proximal e ascendente da aorta de camundongos  $apoE^{-/-}$  alimentados com dieta enriquecida com óleo de *P. volubilis* e de soja

| Parâmetros *        | Aorta - região proximal |                   | Aorta - região ascendente |                   |
|---------------------|-------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|
|                     | Sacha kiruma            | Soja              | Sacha kiruma              | Soja              |
| Área total da aorta | 1.210,09 ± 130,97       | 1.228,36 ± 159,54 | 2.402,30 ± 218,67         | 2.472,41 ± 473,66 |
| Área da luz         | 561,51 ± 73,81          | 592,15 ± 74,84    | 1.244,17 ± 215,59         | 1.329,36 ± 165,66 |
| Área da parede      | 648,59 ± 83,30          | 636,22 ± 95,68    | 1.058,13 ± 155,43         | 1.143,05 ± 388,94 |

\* Valores médios das áreas em  $\mu m^2 \times 10^3 \pm DP$  –desvio padrão.  $p > 0,05$ .



**Figura 7:** Fotomicrografias da porção proximal (A) e ascendente (B) do tronco aórtico de camundongos  $apoE^{-/-}$ . A estrela indica as valvas aórticas. Colorações: Verhoeff (A) e Tricromio de Masson (B), respectivamente. Aumento: 40x. Barra = 50 micrômetros.

O **número médio de lesões ateroscleróticas** (média±desvio padrão) presentes na parede da aorta proximal de camundongos apoE<sup>-/-</sup> tratados com *P. volubilis* (4,25±0,18) ou soja (4,21±0,96) não apresentou diferenças significativas (p>0,05), independente do sexo. No entanto, na parede da porção ascendente da aorta dos animais tratados com *P. volubilis*, o número médio de lesões ateroscleróticas (**0,94±0,12**) foi menor significativamente (p<0,05) do que o de animais que receberam ração contendo óleo de soja (**1,17±0,13**), independente do sexo.

A média da **área de lesões ateroscleróticas** (média ± desvio padrão em  $\mu\text{m}^2 \times 10^3$ ) na parede da aorta proximal e ascendente, respectivamente, de camundongos apoE<sup>-/-</sup> tratados com *P. volubilis* (280,75±62,89; 112,94±70,20) ou soja (259,75±73,09; 64,91±45,80) não apresentou diferenças significativas (p>0,05), independente do sexo.

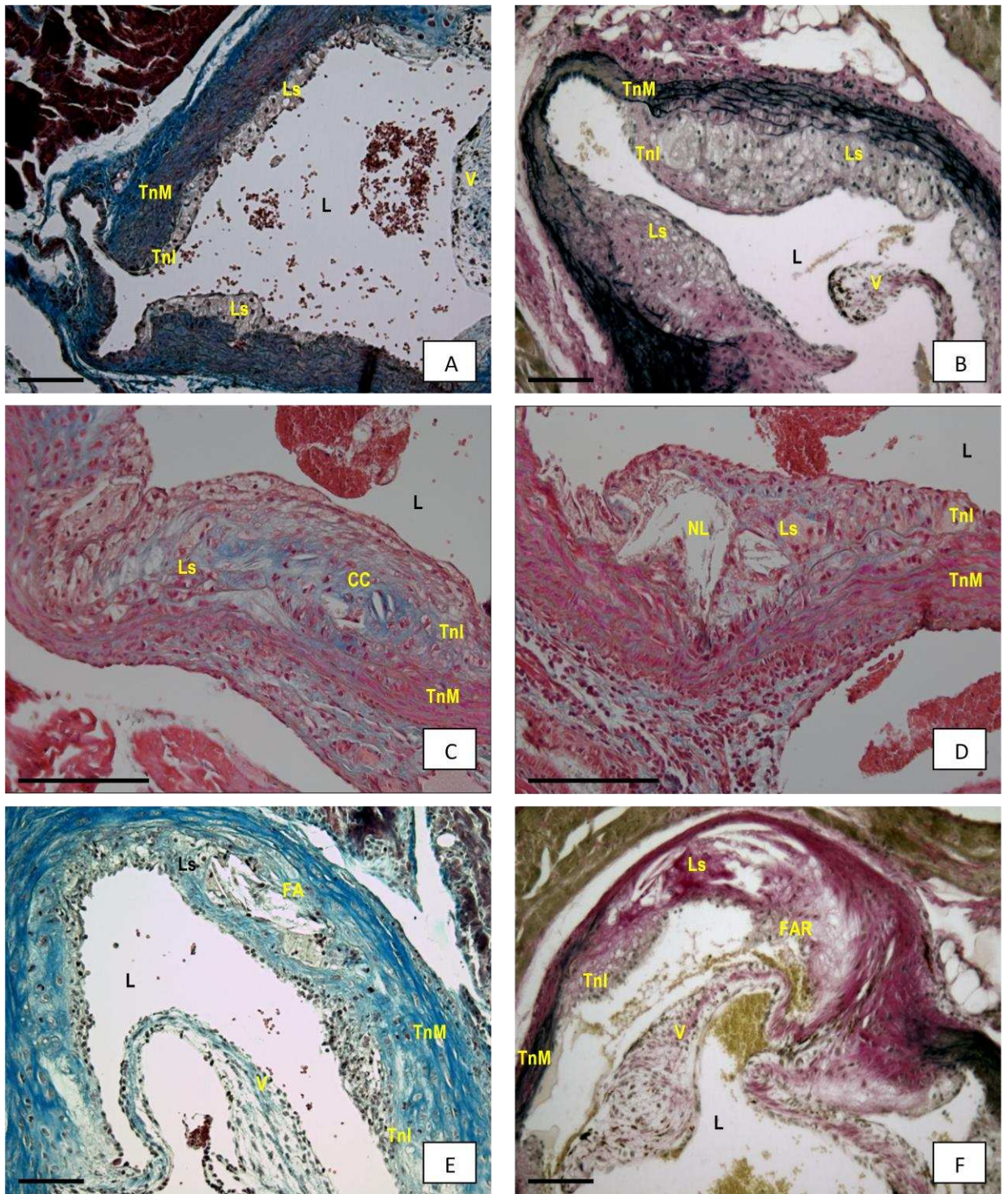
A média da **área total de lesões ateroscleróticas** (média±desvio padrão em  $\mu\text{m}^2 \times 10^3$ ) presentes em aproximadamente 250 $\mu\text{m}$  da parede da aorta proximal e ascendente, respectivamente, de camundongos apoE<sup>-/-</sup> tratados com *P.volubilis* (1.305,49±316,93; 255,75±186,77) ou soja (1.466,62±206,96; 451,76±280,82) não apresentou diferenças significativas (p>0,05), independente do sexo.

A **área média das três maiores lesões ateroscleróticas** (média ± desvio padrão em  $\mu\text{m}^2 \times 10^3$ ) na parede da aorta proximal e ascendente, respectivamente, de camundongos apoE<sup>-/-</sup> tratados com *P. volubilis* (174,23±39,88; 66,49±43,30) ou soja (164,33±9,87; 132,82±120,03) não apresentou diferenças significativas (p>0,05), independente do sexo.

A análise do processo evolutivo das lesões ateroscleróticas (patogênese) e dos tipos histopatológicos de lesões da aorta, demonstra que não houve diferenças significativas entre os tratamentos e sexo, apesar de ter sido observada a presença de lesões terminais na porção proximal e lesões avançadas na porção ascendente de camundongos apoE<sup>-/-</sup> alimentados com dieta contendo soja (**Tabela 16 e Figura 8**).

**Tabela 16:** Frequência (%) das lesões nas porções proximal e ascendente da aorta, de acordo com sua patogênese e tipos histopatológicos, por grupo tratado, independente do sexo dos animais. p>0,05

| Região da Aorta | TRATAMENTO   | PATOGENESE |           |           | TIPOS HISTOPATOLÓGICOS |       |       |       |       |      |      |      |
|-----------------|--------------|------------|-----------|-----------|------------------------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|
|                 |              | Iniciais   | Avançadas | Terminais | I                      | II    | III   | IV    | V     | VI   | VII  | VIII |
| Proximal        | Sacha kiruma | 38,79      | 61,21     | 0         | 0,13                   | 2,74  | 35,92 | 5,74  | 55,47 | 0    | 0    | 0    |
|                 | Soja         | 29,24      | 67,61     | 3,15      | 0                      | 2,54  | 26,70 | 28,02 | 39,12 | 0,47 | 3,15 | 0    |
| Ascendente      | Sacha kiruma | 100,00     | 0         | 0         | 0,65                   | 64,83 | 34,52 | 0     | 0     | 0    | 0    | 0    |
|                 | Soja         | 84,38      | 15,62     | 0         | 0                      | 59,38 | 25,00 | 15,62 | 0     | 0    | 0    | 0    |



**Figura 8:** Fotomicrografias de diferentes tipos histopatológicos de lesões presentes na aorta de camundongos apoE<sup>-/-</sup>: **A e B**–Lesões histopatológicas do tipo II; **C e D**–Lesões histopatológicas do tipo III e IV, respectivamente; **E e F**–Lesões histopatológicas do tipo V e VI, respectivamente. Colorações: **A, C, D e E** –Tricromo de Masson; **B e F** –Verhoeff. **CC**–Cristais de Colesterol; **FA**–Fibroateroma; **FAR**–Fibroateroma com ruptura de superfície; **L**–luz da aorta; **Ls**–lesão aterosclerótica; **NL**–Núcleo Lipídico(Ateroma); **TnI**–Túnica Íntima; **TnM**–Túnica Média; **V**–Válvula aórtica. Barra = 50 micrômetros.

## 6.4. DISCUSSÃO

### 6.4.1. Consumo Alimentar e Desenvolvimento dos Animais

Na literatura consultada, com exceção ao trabalho de Thomazini<sup>24</sup>, não foram identificados outras pesquisas que avaliassem os efeitos biológicos da dieta enriquecida com óleo de sacha kiruma em animais deficientes de apoE<sup>-/-</sup>. Neste estudo, verificou-se que o consumo alimentar dos animais no experimento se enquadrava na faixa de consumo médio da espécie, conforme descrito por Catão-Dias e cols.<sup>25</sup> e Thomazini<sup>24</sup>. Os animais apoE<sup>-/-</sup> tratados com ração enriquecida com o óleo de sacha kiruma, em comparação aos alimentados com dieta contendo óleo de soja, apresentaram maior consumo de ração, indicando que o óleo de sacha kiruma não alterou a aceitabilidade da ração.

Quanto ao índice hepatossomático, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, o que indiretamente corrobora os resultados obtidos por Thomazini<sup>24</sup>, que não verificou qualquer tipo de comprometimento na morfologia do fígado de animais das linhagens apoE<sup>-/-</sup>, tratados com dieta a base de óleo de sacha kiruma ou óleo de soja.

### 6.4.2. Avaliação do Metabolismo Lipídico

Não houve diferença significativa para os valores de colesterol total entre os grupos experimentais. Os valores encontrados no nosso estudo são inferiores aos relatados por Jawieñ e cols.<sup>26</sup> (434±129 mg/dL) e Van Craeyveld e cols.<sup>27</sup> (335±27,5 mg/dL), que também trabalharam com camundongos apoE<sup>-/-</sup> alimentados com dieta padrão. Esta variação na concentração de colesterol total

pode estar relacionada a linhagem e/ou o sexo e, além disso, é influenciada pela idade, dieta, manejo, ambiente e outros fatores<sup>26,28</sup>.

Os lipídios consumidos na dieta são armazenados, principalmente, no tecido adiposo e no fígado. Tanto na gordura abdominal quanto no tecido hepático dos animais estudados, foi observado maior concentração de ácidos graxos insaturados totais em comparação aos saturados totais, independente do tratamento e sexo ( $p < 0,001$ ).

Na avaliação dos ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) totais obteve-se maior concentração destes no fígado de camundongos tratados com soja, havendo diferença entre os sexos, independente do tratamento, fato possivelmente relacionado com a característica das dietas (**Tabela 14**). A ingestão de dietas ricas em monoinsaturados está relacionada com maior acúmulo de lipídios no fígado<sup>29</sup>. Outra alteração fisiológica ocasionada por uma dieta rica em monoinsaturados é o aumento da síntese de VLDL pelo fígado, o que desencadearia maiores níveis de colesterol e triacilgliceróis. Vários estudos demonstraram que o consumo de  $\omega 9$  resulta na redução da incidência de doenças cardíacas, devido a baixos níveis de colesterol e LDLc, inibição da agregação plaquetária e ação antitrombótica<sup>30,31</sup>, o que pode ter contribuído para não termos identificado alterações significativas da histopatologia das lesões na aorta proximal.

Alguns ácidos graxos são chamados de essenciais (AGE) por não serem sintetizados no metabolismo endógeno dos mamíferos e terem que ser consumidos na dieta<sup>31,32</sup>. Entre estes AGE, os  $\omega 3$  e  $\omega 6$ , desempenham várias funções no organismo, como por exemplo: fonte energética; componentes estruturais das membranas celulares, conferindo fluidez a membrana,

participando de processos de difusão de sódio e potássio, receptores de insulina e antígenos; precursores de eicosanoides (prostaglandinas e leucotrienos), que modulam funções cardiovascular, imunológica, reprodutiva e secretora de várias células.

Os sintomas de deficiência de AGE variam de acordo com o tipo de ácido graxo essencial e a fase de desenvolvimento do organismo. A deficiência de  $\omega 6$  leva ao aparecimento de anemia, lesões cutâneas, aumento da agregação plaquetária, trombocitopenia, esteatose hepática, retardo na cicatrização e aumento na susceptibilidade a infecções. Já para o  $\omega 3$  ocorre aparecimento de sintomas neurológicos, redução na acuidade visual, lesões na pele, retardo no crescimento e diminuição da capacidade de aprendizado<sup>31</sup>. De acordo com Waitzberg e Borges<sup>31</sup>, a deficiência de AGE tem sido verificada em várias espécies incluindo humanos, a partir do aumento plasmático de  $\omega 9$ , pela metabolização do ácido oléico ( $\omega 9$ ) e seus derivados, na ausência do fornecimento de  $\omega 6$ . Essa deficiência pode ser detectada quando a razão entre  $C20:3 \ \omega 9 / C20:4 \ \omega 6$  é maior do que 0,2, o que não foi detectado neste experimento.

Nossos resultados indicaram que os PUFA totais e as frações de  $\omega 3$  e  $\omega 6$  variaram sua concentração entre os tratamentos tanto na gordura abdominal quanto no tecido hepático. Os animais tratados com *Plukenetia volubilis* apresentaram maior concentração de PUFA totais e de  $\omega 3$  e um nível menor de  $\omega 6$  e da relação  $\omega 6:\omega 3$ , tanto na gordura abdominal quanto no fígado.

Os ácidos graxos  $\omega 6$  e  $\omega 3$  utilizam a mesma via metabólica para a produção de eicosanoides pró-inflamatórios (ligados às respostas imunológica e inflamação) e a ingestão elevada de  $\omega 6$  em relação a  $\omega 3$  pode levar ao

desenvolvimento de fisiopatologias<sup>29,31</sup>. Contudo, ainda não está claro a faixa adequada da relação entre  $\omega 6:\omega 3$ , pois alguns autores citam menos de 4:1 outros 10:1. No presente experimento os animais alimentados com *P.volubilis* apresentaram uma relação de  $\omega 6:\omega 3$  nos tecidos analisados cerca de 10 vezes menor do que os alimentados com soja.

#### **6.4.3. Morfometria e Lesões Ateroscleróticas da Aorta**

A morfometria das regiões estudadas da aorta (região proximal e ascendente), não variou significativamente ( $p>0,05$ ) nos parâmetros estudados de camundongos apoE<sup>-/-</sup> (área total da aorta, área da luz e área da parede da aorta), independente do tratamento e, ou sexo, o que indica homogeneidade nas áreas de estudo do presente trabalho. Contudo, ao compararmos os valores entre as regiões de estudo, verificamos diferenças significativas para cada característica de estudo, o que está de acordo com a anatomia normal do tronco aórtico.

O estudo quantitativo das lesões ateroscleróticas da aorta indica que animais, independente do sexo, alimentados com dieta enriquecida com o óleo de sacha kiruma, apresentaram diminuição do número de lesões ( $p<0,05$ ) na região ascendente da aorta.

A avaliação qualitativa das lesões ateroscleróticas, considerando sua patogênese e os tipos histopatológicos, não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e sexo nas regiões estudadas da aorta. No entanto, animais que receberam dieta enriquecida com soja apresentaram lesões terminais (tipo VII), na porção proximal da aorta, e lesões avançadas

(tipo IV) na região ascendente da aorta. Esses tipos de lesões ateroscleróticas não foram identificadas em nenhum animal tratado com o óleo de sacha kiruma.

Caligiuri e cols.<sup>33</sup> descreveram o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas ao longo do tempo (16 ou 48 semanas de experimento) em camundongos apoE<sup>-/-</sup> alimentados com dieta normal (de manutenção 4,5% de gordura e 0,02% de colesterol) e avaliaram a influência do sexo na aterosclerose e ativação imune nos apoE<sup>-/-</sup>. Os autores constataram diferenças significativas nas lesões entre machos e fêmeas jovens (16 semanas), sendo maiores e mais avançadas em fêmeas do que em machos. Após 48 semanas as lesões nos machos progredem para um estágio mais avançado, placas fibrogordurosas, não variando significativamente com as fêmeas, tanto na área do vaso quanto na área de lesão.

Contudo, este trabalho, pioneiro na análise do uso do óleo das sementes de *Plukenetia volubilis* para a prevenção da aterosclerose, indica haver necessidade de mais estudos envolvendo o uso deste óleo, rico em ácidos graxos poliinsaturados, em especial o  $\omega$ 3, e uma baixa relação entre  $\omega$ 6: $\omega$ 3, características que tem propriedades anti-inflamatórias e com potencialidade na regressão significativa das lesões ateroscleróticas.

## 6.5. CONCLUSÃO

O tratamento com óleo de sacha kiruma influenciou na maior deposição dos ácidos graxos essenciais (poliinsaturados  $\omega 3$  e  $\omega 6$ ) e menor relação entre  $\omega 3/\omega 6$  no fígado e gordura abdominal de camundongos apoE<sup>-/-</sup>, que pode ter contribuído para o efeito protetor do óleo de sacha kiruma contra o desenvolvimento de uma quantidade menor de lesões ateroscleróticas e do grau avançado e terminal destas.

## 6.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yoshida WB. O processo aterosclerótico: da disfunção endotelial à lesão complexa. In: Bellen BV, Jr Sitrângulo CJ, Burihan E, Silva ES, Júnior ES, Carvalho FC et al., autores. Doença Aterosclerótica Periférica. São Paulo: BBS Editora, 2004: 11-28.
2. Tabas I. Lipids and atherosclerosis. In: Vance DE, Vance JE, editors. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. Oxford: Elsevier, 2008: 579-605.
3. Pesek K, Pesek T, Roginic S. The importance of risk factors analysis in the prevention os cardiovascular disease (CVD). In: PESEK, K. Atherosclerotic Cardiovascular Disease. Rijeka: InTech, 2012: 3-32.
4. Silva JCCB, Moraes MRS, Han SW. Doença aterosclerótica generalizada e aterotrombose: da ciência experimental à abordagem clínica e à terapia gênica. In: Bellen BV, Jr Sitrângulo CJ, Burihan E, Silva ES, Júnior ES, Carvalho FC et al, autores. Doença Aterosclerótica Periférica. São Paulo: BBS Editora, 2004: 29-50.
5. McGuinness J, Neilan TG, Sharkasi A, Bouchier-Hayer D, Redmond JM. Wish oil for the treatment of cardiovascular disease. *Cardiol in Rev.* 2010; 18 (5): 258-263.
6. Hagve TA, Woldseth B, Brox J, Narce M, Poisson JP. Membrane fluidity and fatty acid metabolism in kidney cells from rats fed purified eicosapentaenoic acid or purified docosahexaenoic acid. *Scand J Clin Lab Invest.* 1998; 58 (3): 187-94.
7. Wallace FA, Miles EA, Calder PC. Comparison of the effects of linseed oil and different doses of fish oil on mononuclear cell function in healthy human subjects. *Br J Nutr.* 2003; 89 (5): 679-89.
8. Hamaker BR, Valles C, Gilmar R, Hardmeier RM, Clark D, Garcia HH, et al. Amino acid and fatty acid profiles of the Inca Peanut (*Plukenetia volubilis* L.). *Cereal Chem.* 1992; 69: 461-463.
9. Guillén MD, Ruiz A, Cabo N, Chirinos R, Pascual G. Characterization of Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil by FTIR spectroscopy and <sup>1</sup>H NMR.

- Comparison with linseed oil. Journal of the American Oil Chemists Society. 2003; 80 (8): 755-762.
10. Follegatti Romero LA. Extração de óleo de *sacha inchi* (*Plukenetia volubilis* L.) com dióxido de carbono. Universidade Estadual de Campinas. 2007. Dissertação de Mestrado. 95p.
  11. Fanali C, Dugo L, Cacciola F, Beccaria M, Grasso S, Dachà M, Dugo P, Mondello L. Chemical characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. J Agric Food Chem. 2011; 59 (24): 1343-1349.
  12. Gutiérrez L F, Rosadab LM, Jiménez A. Chemical composition of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction. Grasas y Aceites. 2011; 62 (1): 76-83.
  13. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr. 1993; 123: 1939-1951.
  14. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem. 1957; 226(1): 497-509.
  15. Hartmann L, Lago RCA. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Lab Pratic. 1973; 22: 475-477.
  16. Paiva FP, Mafili VV, Santos ACS. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Salvador: Fundação Osvaldo Cruz (Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz). 2005. 28p.
  17. Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J Cell Biol. 1965; 27: 137-138.
  18. Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer AO, Neto AGF. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. Barueri: Manole, 2003: 331p.
  19. LAP – Laboratório de Anatomia Patológica da UNICAMP. Técnica de Verhoeff. Acessado em 2010: <http://anatpat.unicamp.br/tecnicashistologicas.html#t7a>

20. Van Vré EA, Van Beusekom HM, Vrints CJ, Bosmans JM, Bult H, Van der Giessen WJ. Stereology: a simplified and more time-efficient method than planimetry for the quantitative analysis of vascular structures in different models of intimal thickening. *Cardiov Pathol*. 2007; 16 (1): 43-50.
21. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams A. Quantitative assessment of atherosclerosis lesions in mice. *Atheroscler*. 1987; 68: 231-240.
22. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 1177-1178.
23. Rosa DD. Lesões pré-neoplásicas, perfil lipídico, marcadores inflamatórios e aspecto histológico intestinal de ratos wistar alimentados com dieta à base de diferentes óleos. Universidade Federal de Viçosa. 2010. Dissertação de Mestrado. 127p.
24. Thomazini BF. Avaliação do óleo de sacha kiruma (*Plukenetia volubilis* L.) no duodeno e fígado de camundongos C57BL/6 e apoE<sup>-/-</sup>. Universidade Federal de Viçosa. 2011. Dissertação de Mestrado. 71p.
25. Catão-Dias JL, Cubas ZS, Silva JCR. Tratado de Animais Silvestres. São Paulo: Editora Roca. 2006. 1376p.
26. Jawieñ J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Phys Phar*. 2004; 55 (3): 503-517.
27. Van Craeyveld E, Gordts SC, Singh N, Jacobs F, De Geest B. A critical reassessment of murine and rabbit models of atherosclerosis: focus on lesion progression and remodelling. *Acta Cardiol*. 2012; 67 (1): 11-21.
28. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler and Thromb*. 1994; 14 (1): 133-140.
29. Aguilar EC. Efeitos do óleo de pequi (*Caryocar brasilienses* Camb.) sobre a aterogênese e o estresse oxidativo em camundongos LDL receptor *knockout* alimentados com dieta aterogênica. Universidade Federal de Minas Gerais. 2010. Dissertação de Mestrado. 98p.

30. Costa RP, Meale MMS. Terapia nutricional oral em cardiologia. In: Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. São Paulo: Editora Atheneu, 2004: 525-541.
31. Waitzberg DL, Borges VC. Gorduras. In: Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. São Paulo: Editora Atheneu, 2004: 55-78.
32. Jones PJH, Kubo S. lipídeos, esteróis e seus metabólitos. In: Nutrição moderna na saúde e na doença. Barueri: Manole, 2009: 100-132.
33. Caligiuri G, Nicoletti A, Zhou X, Törnberg I, Hansson GK. Effects of sex and age on atherosclerosis and autoimmunity in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis*. 1999; 145: 301-308.

## 7. CONCLUSÃO GERAL

As sementes de espécimes de *Plukenetia volubilis*, cultivadas no município de Viçosa (MG), apresentam concentração de óleo e perfil de ácidos graxos similares àqueles já relatados na literatura.

A dieta enriquecida com o óleo de *P. volubilis*, ofertada a camundongos Black, influenciou positivamente: (i) as concentrações de ácidos graxos essenciais ( $\omega 3$  e  $\omega 6$ ) da gordura abdominal e do fígado; (ii) a concentração de PUFA total da gordura abdominal; (iii) a concentração de ácidos graxos poliinsaturados totais do fígado; (iv) a relação de  $\omega 6:\omega 3$ , que é 12,18 vezes menor, na gordura abdominal.

Os camundongos apoE<sup>-/-</sup> tratados com óleo de *P. volubilis* apresentaram maior consumo, o que pode ser indicativo de melhor aceitabilidade dessa dieta em comparação com a dieta controle (com adição de óleo de soja).

O tratamento com óleo de *P. volubilis* influenciou a maior deposição dos ácidos graxos essenciais (poliinsaturados  $\omega 3$  e  $\omega 6$ ) e menor relação entre  $\omega 6:\omega 3$  no fígado e gordura abdominal de camundongos Black e apoE<sup>-/-</sup>, que pode ter efeito benéfico devido as suas propriedades biológicas, principalmente a anti-inflamatória.

O número de lesões ateroscleróticas na porção ascendente do tronco aórtico de animais apoE<sup>-/-</sup> tratados com o óleo de *P. volubilis* foi menor significativamente do que de animais que receberam dieta com óleo de soja. A análise morfométrica das lesões ateroscleróticas nas regiões proximal e ascendente do tronco aórtico não revelou diferenças significativas entre os grupos, contudo nenhum animal que recebeu dieta contendo óleo de *P. volubilis*

apresentou lesões do tipo terminal na porção proximal e lesões avançadas na porção ascendente do tronco aórtico. Estes resultados sugerem um possível efeito protetor contra a formação de ateromas após o tratamento com esta dieta, possivelmente devido ao efeito anti-inflamatório do  $\omega$ 3.

Sugere-se a realização de estudos toxicológicos e de pesquisas, em outros períodos de tempo do processo aterosclerótico, que visem analisar a morfologia, a morfometria e a histopatologia da aorta de animais alimentados com dieta contendo óleo de *P. volubilis*.

## APÊNDICE I – OBTENÇÃO DO ÓLEO DAS SEMENTES DE *Plukenetia volubilis*

### I – Obtenção e desumidificação das sementes

De espécimes que atingiram a maturidade foram feitas três colheitas ao longo dos meses de maio a junho de 2010. Estas sementes foram secas em temperatura ambiente por 15 dias. Realizou-se a desumidificação das sementes por meio de estufa com circulação e renovação de ar TE- 394/2, Tecnal®, do Laboratório de Micorrizas do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, a 45°C por 24 horas (**Figura 9 e 10**).



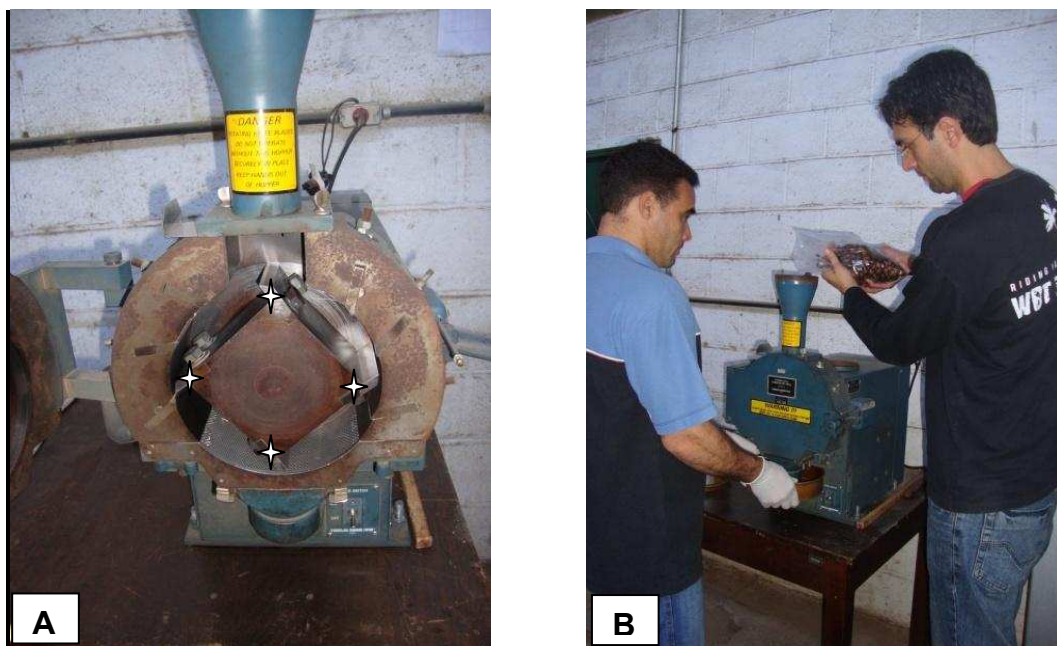
**Figura 9:** Sementes de *Plukenetia volubilis*.



**Figura 10:** Estufa de desumidificação Laboratório de Micorrizas do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa.

## II – Moagem

As sementes desumidificadas (total de 2.127,27g) foram moídas em Moinho de Rotor Vertical com facas móveis e fixas do Laboratório de Painéis e Energia da Madeira do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa no mês de julho de 2010 (**Figura 11**). Obteve-se 2.039,38 g de sementes moídas (**Figura 12**).



**Figura 11:** (A) Moinho de Rotor Vertical com facas móveis (estrelas), acopladas a um eixo ligado diretamente ao motor do equipamento, e facas fixas; (B) Alimentação do moinho para o processo de moagem.



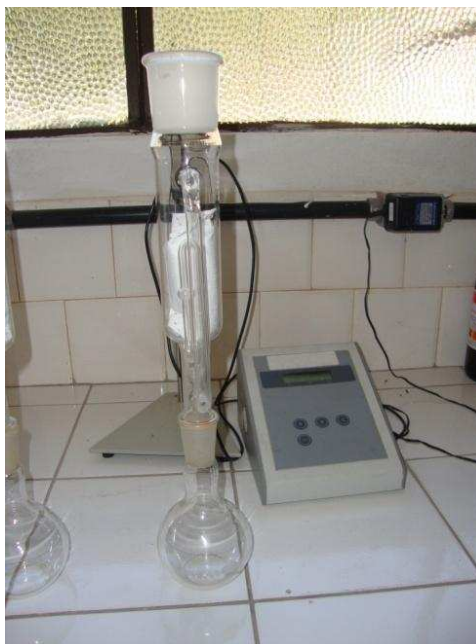
**Figura 12:** Sementes após processo de moagem.

### III – Extração do óleo de *Plukenetia volubilis*

Para a extração do óleo das sementes de *P. volubilis* utilizou-se o protocolo metodológico de extração por solvente (Hexano), devido ao alto teor de lipídeos, do Laboratório de Sementes do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa.

#### a. Extração

Cinquenta gramas (50g) ou 100g de sementes moídas foram colocadas em cartuchos de extração, confeccionados com papel de Germinação de Sementes (de 65 g), sendo o tamanho dos cartuchos padronizados de acordo com o Extrator com Soxhlet's de 500 mL (**Figura 13**).



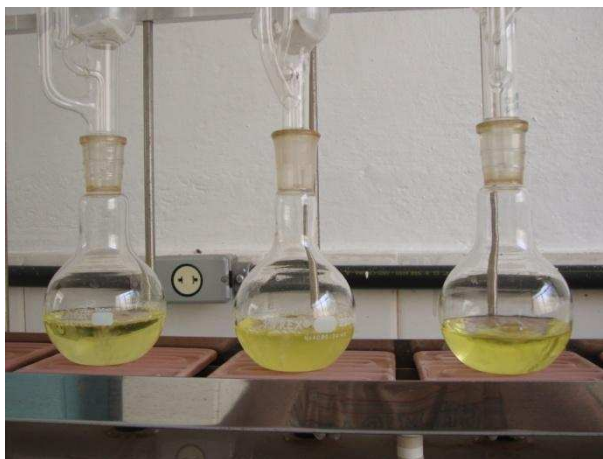
**Figura 13:** Balão de fundo chato acoplado ao Soxhlet's com cartucho antes de iniciar o processo de extração.

Cada etapa de extração foi realizada sob uma temperatura da chapa aquecedora sob os Soxhlet's de 68°C a 70°C e 16°C  $\pm$ 1°C da água do condensador, durante 24 horas (**Figura 14**).



**Figura 14:** Etapa de extração contendo seis Soxhlet's sob a placa aquecedora, acoplados ao condensador.

Após o processo de extração, foram obtidas misturas amareladas contendo hexano e óleo de *P. volubilis* conforme **Figura 15**. Imediatamente, estas misturas foram filtradas a vácuo por meio da utilização de Bomba de 1,5 HP e papel de filtro com porosidade de 11, a fim de retirar qualquer partícula residual do processo de extração (**Figura 16**).



**Figura 15:** Solução contendo hexano e óleo, de cor amarelada, obtida após o processo de extração.



**Figura 16:** Processo de filtração a vácuo da mistura obtida após extração.

### **b. Destilação utilizando evaporador rotativo com vácuo**

Em seguida procedeu-se a retirada do hexano da mistura obtida na etapa descrita anteriormente, a fim de obter o óleo de *P. volubilis*. Para isso, foi seguido o protocolo (a seguir) e foram utilizados os seguintes equipamentos do Laboratório de Sementes, Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa: (i) evaporador rotativo a vácuo (condensador vertical – temperatura de trabalho a 60°C); (ii) Banho ultratermostaticado com bomba de circulação (temperatura da água para o condensador do evaporador de 16°C ± 0,1°C); (iii) balão de fundo redondo (**Figura 17**).



**Figura 17:** Evaporador rotativo iniciando o processo de destilação da mistura (coloração amarela – balão em Banho-Maria).

Protocolo de destilação com rota vapor:

**b.1.** Homogeneização do sistema com balão contendo apenas hexano, por 30 minutos;

**b.2.** Colocação de balão no rotavapor contendo a amostra a ser purificada. Inicia-se com temperatura de 30°C e, vagarosamente, esta foi aumentada até 60°C. A temperatura elevada leva a evaporação do hexano da amostra, levando o gás para o condensador e, em contato com a água resfriada, condensava e caía no balão de fundo redondo para ser posteriormente reaproveitado (**Figura 18**).



**Figura 18:** Evaporador rotativo finalizando o processo de destilação, contendo óleo no balão em Banho-Maria e hexano recuperado (seta).

### **c. Borbulhar com nitrogênio**

Etapa final do processo de extração do óleo possui os seguintes objetivos: (i) eliminar qualquer resíduo de solvente que ainda esteja presente na amostra; (ii) retirar todo o oxigênio da amostra, evita a oxidação dos ácidos graxos do óleo.

A amostra de óleo foi transferida para um kitasato em banho-maria a 55°C. Um cateter com uma seringa, adaptado a partir de um balão de nitrogênio foi introduzido inserido no kitasato e, em constante e delicado movimento, borbulhou-se nitrogênio na amostra durante 10 minutos (**Figura 19**).

Ao fim desta etapa foi obtido o óleo puro que foi armazenado em frasco âmbar a -20°C.



**Figura 19:** Processo final na obtenção do óleo, por meio da injeção de nitrogênio no óleo.

## APÊNDICE II – PREPARO DAS DIETAS

Utilizou o protocolo de preparo de ração adotado no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição e Saúde do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, este consistia dos seguintes passos:

1. Em uma bacia média ou bandeja, foi acrescentado os ingredientes de menor para maior volume, misturando sempre. O óleo foi colocado, por último, aos poucos, de modo a formar um “fio de óleo” com a massa, sobre constante agitação;
2. A massa produzida passou por um processo de peneiramento para homogeneização, de duas a três vezes;
3. A massa foi adicionada em um misturador industrial, por 15 minutos. Nos 5 e 10 minutos iniciais o misturador foi parado e toda massa recolocada de forma que a hélice do misturador pudesse atingir;
4. Após a homogeneização, a massa foi colocada em bacia grande para acréscimo lento de água destilada (aproximadamente 250 mL para 1 Kg de massa). A homogeneização foi feita manualmente, com luvas descartáveis, até a massa atingir o ponto ideal para fazer os “*pellets*” da ração.

As dietas foram produzidas em forma de “*pellets*” e após o preparo, armazenadas de 0° e 4°C, protegidas da luz até o momento da sua utilização.

## APÊNDICE III – EUTANÁSIA E COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

No processo de eutanásia dos animais do experimento foram seguidos todos os procedimentos em termos de bem-estar animal descritos por Paiva et al. (2005):

- utilização de método sem dor, no qual os animais atinjam rapidamente o estado de inconsciência e morte;
- uso de pouca contenção e excitabilidade dos animais;
- ser apropriado para a idade e estado de saúde dos animais;
- causar o mínimo de sofrimento e estresse;
- ter simples administração;
- ser seguro para o operador;
- ser realizado distante de outros animais.

Para isso, após jejum por 12 horas, cada animal foi colocado em uma câmara semifechada, acoplada a uma entrada de dióxido de carbono. Após a inconsciência do indivíduo (estado de anestesia) e com o coração batendo foram feitos os seguintes passos:

- ✓ avaliação do estado de profundidade anestésica, pela Veterinária responsável do experimento, por meio da presença ou ausência de sinais reflexos palpebral e corneal e alteração da frequência cardiorespiratória. Após obtido o estado profundo de anestesia e não consciência do indivíduo, seguia-se com os procedimentos abaixo;
- ✓ fixação, em placa de parafina, em decúbito ventral;
- ✓ incisão inicial pela cavidade abdominal-pélvica;
- ✓ abertura da caixa torácica, pela ruptura do osso esterno, e, posteriormente incisão lateral das costelas e rebatimento da caixa torácica anterior;
- ✓ rebatimento dos órgãos internos;
- ✓ identificação da veia cava torácica e aorta torácica descendente e incisão para retirada e coleta do sangue do animal;
- ✓ ruptura do pericárdio visceral;

- ✓ evisceração para coleta dos órgãos (Coração, Fígado, Rins, Gordura Abdominal e Gônadas), que após a retirada procedia-se com a aferição da massa de cada órgão em balança analítica;
- ✓ retirada da calota cranial para coleta do Encéfalo e aferição de sua massa;
- ✓ todos os órgãos foram lavados em solução fisiológica, para a retirada do excesso de sangue e coagulado, em seguida fixados conforme descrito nos procedimentos histológicos (**Apêndice VII**).

## APÊNDICE IV – ANÁLISE COLESTEROL TOTAL

Princípio do kit enzimático colorimétrico da empresa Bioclin<sup>®</sup> – Quibasa Química Básica LTDA – (Colesterol Monoreagente, código interno K083-2. Registro na ANVISA de número 10269360141):

- os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase (COE) à colesterol livre e ácidos graxos;
- o colesterol livre é oxidado pela colesterol-3-ona (COD), sendo acrescido peróxido de hidrogênio;
- o peróxido de hidrogênio, na presença da peroxidase (POD) reage com a 4-aminoantipirina e fenol, formando um cromógeno vermelho cereja cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de colesterol.

Foi utilizado 3µL de soro das amostras, na qual foi adicionado 300 µL do reagente enzimático do kit, homogeneizado e incubado a 37°C por 10 minutos. Em seguida realizou-se a leitura no espectrofotômetro UV/VIS *Multiskan<sup>®</sup>GO* (*Thermo Fisher Scientific*), interligado ao software *Skant 3.2 for Multiskan<sup>®</sup>GO*, utilizando como comprimento de onda em 500nm. Equipamento do Laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa (**Figura 20**). A concentração de colesterol total foi determinada a partir da absorbância do padrão do kit (200mg/dL).



**Figura 20:** Espectrofotômetro UV/VIS do Laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição da UFV.

## APÊNDICE V – EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS E ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

### a) Extração de Lipídeos totais

Para a extração de lipídeos totais nos tecidos analisados foi utilizado a técnica de Folch et al. (1957) modificada, sendo utilizado 30mg, 100mg e 50mg de amostras do óleo de *Plukenetia volubilis*, fígado e gordura intra-abdominal, respectivamente. Cada amostra foi inserida em um tubo de ensaio (identificado), onde foi adicionado 1,9mL de clorofórmio:metanol (2:1) e macerada com bastão de vidro. O tubo foi submetido à homogeneização em vórtex por 3 minutos, posteriormente adicionado 0,4mL de metanol (P.A.) e centrifugado por 3 minutos a 10.000rpm em centrífuga Quimis<sup>®</sup>. O sobrenadante foi retirado com cuidado para um tubo de ensaio com tampa rosqueável, seco, pesado e identificado, no qual foi acrescentado 0,8mL de clorofórmio P.A. e 0,64mL de solução de NaCl a 0,73%, homogeneizado em vórtex por 30 segundos e novamente centrifugado por 10 minutos a 10.000rpm. Em seguida, a fase superior foi desprezada, utilizando uma pipeta Pasteur, e a parede do tubo de ensaio foi lavada, cuidadosamente, três vezes com 0,3mL de **solução de Folch** (APÊNDICE VI), sendo o sobrenadante descartado. O tubo de ensaio foi seco em estufa semi-aberta a 40°C, até que o solvente tenha evaporado por completo (*overnight*), e novamente pesados. Por gravimetria, foi determinada a massa de lipídeos das amostras analisadas.

### b) Saponificação e Esterificação

O método de Hartman e Lago (1973) foi utilizado para a saponificação e esterificação de 50mg de amostra extraída e retirada do fundo do tubo de ensaio da etapa anterior (extração de Lipídeos totais). Esta massa de 50 mg foi depositada em um tubo no qual foi adicionado 4mL do **reagente de saponificação** (APÊNDICE VI). O tubo de ensaio foi agitado em vórtex e deixado por 15 minutos em banho-maria a 80°C. Em seguida, foi colocado neste tubo 10mL do **reagente de esterificação**. O tubo de ensaio foi agitado em vórtex e deixado por 15 minutos em Banho-Maria a 80°C. O tubo foi resfriado a

temperatura ambiente à 40°C, posteriormente, adicionado 5mL de NaCl a 20% e 0,5 mL de hexano (grau HPLC) e agitado em vórtex por 30 segundos. O sobrenadante foi retirado e transferido para um frasco âmbar com tampa, limpo, seco e identificado. Ao restante no tubo de ensaio foi adicionado mais 0,5mL de hexano para ser novamente retirado o sobrenadante e colocado no mesmo frasco âmbar. O conteúdo do frasco âmbar foi seco em nitrogênio, para evaporação do hexano, e armazenado em -20°C até a análise cromatográfica.

### c) Análise cromatográfica

As amostras foram retiradas do congelador, deixando 5 minutos a temperatura ambiente, resuspendidas com 600µL (fígado) ou 1.000µL (gordura abdominal ou óleo) de hexano para cromatografia (HPLC) e colocadas em “vials” novos. Foi utilizado o cromatógrafo gasoso, modelo CG-17 *Shimadzu/Glass* (**Figura 21**), equipado com detector de ionização em chama e coluna capilar de sílica fundida de biscianopropil polysiloxane (SP-2560), com 100m de comprimento e 0,25mm de diâmetro, do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa.



**Figura 21:** Cromatógrafo gasoso do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição do CCB da UFV.

As condições de análise utilizaram a seguinte programação: temperatura inicial de 140°C, isotérmica por 5 minutos e posterior aquecimento de 4°C por minuto até atingir 240°C, permanecendo nesta temperatura por 20 minutos. A temperatura do injetor foi de 240°C e do detector de 260°C. O gás de arraste

utilizado foi o nitrogênio com vazão de 24cm por segundos. Foi injetado 1µL da amostra resuspendida em hexano para cromatografia. O tempo total da corrida por amostra foi de 50 minutos.

Como padrão, foi utilizado a mistura de ácidos graxos (FAME – *Supelco<sup>TM</sup> de C4 à C24*) da *Sigma-Aldrich<sup>®</sup>* (USA), lote LB86982, fabricado em 04/11/2011 e valido até 01/09/2014. A identificação e quantificação dos componentes da amostra foram realizadas pela comparação dos resultados obtidos do padrão com os das amostras, picos obtidos por tempo de retenção, sendo quantificados automaticamente e os resultados expressos em percentual.

# APÊNDICE VI – SOLUÇÕES PARA EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS

## 1. Solução de Folch

- ✓ 3% de clorofórmio;
- ✓ 48% de metanol;
- ✓ 47% de água destilada;
- ✓ 2% de NaCl a 29%.

Misturar os componentes por 10 minutos em um agitador magnético. Armazenar em frasco âmbar.

## 2. Reagente de Saponificação

- ✓ 2g de NaOH;
- ✓ 100mL de metanol.

Armazenar em recipiente plástico.

# APÊNDICE VII – PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

## 1º – TÉCNICAS DE INCLUSÃO

### I – Paraplast

Os fragmentos de coração foram colocados em “K-sets” e identificados para passarem pelos seguintes procedimentos:

#### A) Desidratação e diafanização

| <b>Solução</b>                | <b>Tempo (horas)</b> |
|-------------------------------|----------------------|
| Álcool 80°C                   | 12 à 16              |
| Álcool 90°C                   | 01                   |
| Álcool 95°C                   | 01                   |
| Álcool Absoluto I             | 01                   |
| Álcool Absoluto II            | 01                   |
| Álcool Absoluto III           | 01                   |
| Álcool Absoluto + Xilol (1:1) | 01                   |
| Xilol I                       | 01                   |
| Xilol II                      | 01                   |
| Xilol III                     | 01                   |

#### B) Inclusão em paraplast

Após a diafanização os fragmentos em “K-sets” seguiram para banhos em estufa de paraplast a 60°C:

| <b>Banhos</b> | <b>Tempo (horas)</b> |
|---------------|----------------------|
| Banho I       | 01                   |
| Banho II      | 01                   |
| Banho III     | 01                   |

#### C) Montagem dos blocos

Cada bloco de paraplast com o fragmento foi fixado em um bloco de madeira, sendo as laterais aparadas, isto é, a retirada do excesso de paraplast dos lados da peça emblocada, a fim de minimizar o enrugamento do corte no processo de microtomia.

## **2º – PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS PARA RECEBER OS CORTES EM PARAPLAST**

As lâminas onde serão colocados os cortes foram limpas e desengorduradas previamente, utilizando os seguintes procedimentos:

- Após as lâminas terem sido retiradas da embalagem, individualmente, foram colocadas em um becker de 250 mL contendo uma solução de álcool absoluto e detergente;
- As lâminas permaneceram nesta solução no mínimo 1 hora, posteriormente procedeu-se o enxágüe individual das lâminas, de forma abundante até que o detergente tivesse sido totalmente retirado;
- Transferência das lâminas para um becker de 250 mL contendo álcool absoluto, permanecendo até o momento que foram utilizadas, quando então foram secas com papel absorvente.

### **3º – TÉCNICAS DE COLORAÇÃO**

#### **I – DESPARAFINIZAÇÃO E HIDRATAÇÃO**

Antes de iniciar o procedimento, os cortes foram passados em estufa a  $\pm 58^{\circ}\text{C}$ , por no mínimo 30 minutos.

| <b>Soluções</b>               | <b>Tempo (minutos)</b> |
|-------------------------------|------------------------|
| Xilol IIII                    | 15                     |
| Xilol II                      | 05                     |
| Xilol I                       | 05                     |
| Álcool Absoluto + Xilol (1:1) | 05                     |
| Álcool Absoluto III           | 05                     |
| Álcool Absoluto II            | 05                     |
| Álcool Absoluto I             | 05                     |
| Álcool 95°C                   | 05                     |
| Álcool 80°C                   | 05                     |
| Álcool 75°C                   | 05                     |

A hidratação final consistiu da passagem em água corrente.

## II – TRICRÔMICO DE MASSON

Algumas lâminas, da raiz do tronco aórtico, foram submetidas ao seguinte protocolo do Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa:

| Etapas                               | Procedimento                                     | Tempo (minutos) |
|--------------------------------------|--|-----------------|
| 1                                    | Hidratação em água de torneira                   | 10              |
| 2                                    | Coloração com Hematoxilina de Harris             | 02              |
| 3                                    | Lavar e banhar com água de torneira              | 10              |
| 4                                    | Banho em Fuccina ácida (Escarlate Biebrich)      | 01              |
| 5                                    | Lavagem em água destilada (enche-troca-enche...) | 10              |
| 6                                    | Banho com Ácido Fosfotúngstico/Fosfomolibidico   | 10              |
| 7                                    | Banho com Anilina-Acética                        | 10              |
| 8                                    | Lavagem em água destilada (enche-troca-enche...) | 05              |
| 9                                    | Banho com Ácido Acético 1%                       | 03              |
| 10                                   | Banho com Água destilada                         | 05              |
| <b>DESIDRATAÇÃO E DIAFANIZAÇÃO</b>   |  |                 |
| 11                                   | Álcool 95°C                                      | 05              |
| 12                                   | Álcool Absoluto I                                | 02              |
| 13                                   | Álcool Absoluto II                               | 02              |
| 14                                   | Álcool Absoluto III                              | 02              |
| 15                                   | Álcool Absoluto + Xilol (1:1)                    | 02              |
| 16                                   | Xilol I  | 02              |
| 17                                   | Xilol II   | 02              |
| 18                                   | Xilol III  | 02              |
| <b>MONTAGEM em Entellan® (Merck)</b> |  |                 |

Como resultados foram obtidos as seguintes tonalidades e evidenciação de estruturas específicas:

- **em vermelho:** citoplasma, fibras musculares, fibras intercelulares;
- **em azul ou verde:** fibras colágenas, muco, cartilagem e osso;
- **em azul ou azul escuro:** núcleos.

### III – VERHOEFF

Foi utilizado o protocolo da Técnica de Verhoeff adotado no Laboratório de Anatomia Patológica da UNICAMP (LAP, 2010). No entanto, houve necessidade de pequenos ajustes no protocolo, para que fossem obtidas lâminas com histoquímica de evidência ideal desta técnica. O protocolo ajustado utilizado foi o descrito a seguir.

| Etapas                               | Procedimento                                      | Tempo* |
|--------------------------------------|---|--------|
| 1                                    | Lavar em água destilada                           | 01 min |
| 2                                    | Banho com a Solução corante para Fibras Elásticas | 25 min |
| 3                                    | Lavar e Banhar com água corrente                  | 10 min |
| 4                                    | Lavar com água destilada – 2 vezes rapidamente    | 30 seg |
| 5                                    | Diferenciar com Cloreto Férrico a 2%              | 10 seg |
| 6                                    | Banho com Tiosulfato de Sódio 5%                  | 01 min |
| 7                                    | Lavar e banhar em água destilada                  | 05 min |
| 8                                    | Contracorar com a Solução de Van-Gieson           | 30 seg |
| <b>DESIDRATAÇÃO E DIAFANIZAÇÃO</b>   |   |        |
| 9                                    | Álcool 70°C                                       | 45 seg |
| 10                                   | Álcool 90°C                                       | 45 seg |
| 11                                   | Álcool Absoluto I                                 | 45 seg |
| 12                                   | Álcool Absoluto + Xilol (1:1)                     | 45 seg |
| 13                                   | Xilol I   | 45 seg |
| 14                                   | Xilol II  | 45 seg |
| <b>MONTAGEM em Entellan® (Merck)</b> |   |        |

\*Tempo: min – tempo em minutos; seg – tempo em segundos.

Posteriormente, lâminas contendo secções da raiz da aorta foram coradas com esta técnica e obteve-se as seguintes tonalidades e evidência de estruturas específicas:

- **em azul escuro:** fibras elásticas;
- **de preto à azul:** núcleos;
- **de róseo à vermelho:** fibras colágenas;
- **tons amarelados:** outros elementos, tais como fibras musculares e células da glia.