

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
Centro de Ciências Exatas e Naturais
Departamento de Química
Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia

**SÍNTESE QUÍMICA DA DIENANTINA E DA TRIENANTINA E
AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO CONSUMO CRÔNICO EM RATOS**

Terezinha da Rocha Ataíde

Orientador:
Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de doutor.

Maceió, 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
Centro de Ciências Exatas e Naturais
Departamento de Química
Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia

**SÍNTESE QUÍMICA DA DIENANTINA E DA TRIENANTINA E
AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO CONSUMO CRÔNICO EM RATOS**

Terezinha da Rocha Ataíde

Maceió, 2004

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

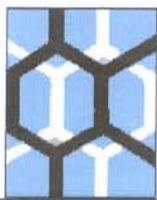
A862s Ataide, Terezinha da Rocha.
Síntese química da dienantina e da trienantina e avaliação toxicológica do consumo crônico em ratos / Terezinha da Rocha Ataide. – 2004.
119 f. : il. tabs., graf.

Orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana.
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química. Maceió, 2004.

Bibliografia: f. 106-112.
Apêndices: f. 113-119.

1. Trienantina – Toxicologia. 2. Dienantina – Toxicologia. 3. Avaliação toxicológica. 4. Dietoterapia. I. Título.

CDU: 577.115:612.39



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**
Departamento de Química
Universidade Federal de Alagoas
Tel. 55 82 3214-1384 Fax. 55 82 3214-1389
www.qui.ufal.br

Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57072-970
Maceió-AL
Brasil

Os membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutorado de Terezinha da Rocha Ataíde, intitulada: "**Síntese Química da Dienantina e da Trienantina e Avaliação Toxicológica do Consumo Crônico em Ratos**", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 18 de março de 2004, às 9 h 30 min, na Sala de Multimeios do bloco 13, consideraram a candidata **APROVADA**.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana
Orientador – PPGQB/DQ/UFAL
CPF: 118.677.606-49

Prof^a. Dr^a. Ana Durce Oliveira da Paixão
Fisiologia-Farmacologia/UFPE
CPF: 431.256.034-04

Prof^a. Dr^a. Telma Maria Menezes Toledo Florêncio
Departamento de Nutrição/UFAL
CPF: 348.314.104-97

Prof^a. Dr^a. Barry Victor Charlwood
PPGQB/DQ/UFAL
CPF: 007.431.234-09

Prof^a. Dr^a. Lúcia Maria Conserva
PPGQB/DQ/UFAL
CPF: 160.564.264-91

***À minha família,
que torna tudo
significativo.***

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana pela orientação e exemplo profissional que muito contribuíram para a minha formação acadêmica.

À Lizete Gomes, graduanda do Curso de Farmácia pela UFAL e às nutricionistas Fabiana Menezes e Maria Cristina Tavares, pela participação efetiva no decorrer dos trabalhos e pela leveza, seriedade e profissionalismo, sempre presentes.

À Fundação Educacional Jayme de Altavila-FEJAL, pela doação dos animais de laboratório e pela receptividade com que sempre nos atendeu.

À médica veterinária Ana Lídia Vasco Peixoto da Silva, coordenadora do biotério de origem dos animais, pela assistência veterinária, orientações técnicas e demais contribuições gentilmente prestadas ao trabalho.

À médica patologista Maria do Carmo Lins Vasconcelos Balwani do Setor de Patologia do Hospital Universitário da UFAL, pela leitura das lâminas histológicas.

Ao corpo técnico do Setor de Patologia do Hospital Universitário da UFAL, pela presteza com que sempre nos atendeu.

À Dra. Telma Pinheiro, diretora do Laboratório Central Dr. Aristeu Lopes, pelas análises bioquímicas realizadas. Aos técnicos Maria Divonete Gomes das Neves, Luzia Amaral e Jorge Alves da Silva Filho, pela execução das análises.

À bióloga Marta Lúcia da Silva, técnica de laboratório do Biotério Central da UFAL, pelas orientações técnicas gentilmente prestadas.

Ao Antônio Soares da Silva, técnico de laboratório, e João Florentino dos Santos, auxiliar de laboratório, do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia/CCBi/UFAL, pelos exames parasitológicos de fezes dos animais e apoio no biotério de experimentação.

Ao Antônio Soares da Silva e Bento Craveiro Barbosa Filho, pelas contribuições nas análises de proteínas.

Ao Valdemar Cassiano dos Santos, técnico de laboratório do Centro de Patologia de Maceió-CEPAMA, pela confecção das lâminas histológicas.

Ao José Ginaldo da Silva Júnior, do Laboratório de Eletroquímica do Departamento de Química/CCEN/UFAL, pelas análises cromatográficas.

Aos professores Geraldo Veríssimo e Silvio Chagas pelas orientações nas análises estatísticas.

Aos professores Denise Pinheiro, Dennis Imbroisi, Haroldo Ferreira da Silva, José de Souza Leão, Marília Goulart, Petrúcio Públio Pereira Barbosa e Sônia Salgueiro, pelas orientações e inestimáveis contribuições ao trabalho.

Aos colegas do Departamento de Nutrição da UFAL, pelo apoio necessário à realização do curso.

Aos estudantes de iniciação científica do Laboratório de Nutrição Básica e Aplicada do Departamento de Nutrição/CSAU/UFAL, pelas contribuições na rotina do biotério de experimentação.

Aos colegas de laboratório Maria Raquel Lima, Janira Lúcia Couto e Josiane Luna, pelas contribuições para o trabalho.

Ao Aldy dos Santos, Cenira Monteiro de Carvalho, Margarida Teodoro e Rejane Montenegro, por todas as pequenas grandes coisas que tornam tudo possível.

Aos colegas de laboratório que contribuíram para a construção de um ambiente de trabalho agradável, mantendo a harmonia e exercitando a solidariedade.

A Deus, que tudo proporcionou.

RESUMO

Os triacilgliceróis de cadeia média (TCM) são recomendados como fonte de energia rapidamente oxidável para pacientes nos períodos pré- e pós-operatório, queimados e portadores de câncer, além daqueles que apresentam distúrbios da absorção e/ou metabolismo dos triacilgliceróis de cadeia longa. Os TCM são encontrados na gordura do leite e nos óleos de coco e palma. Ácidos graxos de cadeia curta e média contribuem com aproximadamente 3% da ingestão total diária de lipídios dietéticos. Os TCM têm sido sintetizados a partir do glicerol e de ácidos graxos de cadeia média, em reações de esterificação ou interesterificação química ou enzimática. Este trabalho teve por objetivo sintetizar ésteres do glicerol com o ácido graxo enântico, por via química, e avaliar o potencial tóxico do consumo crônico desses ésteres sobre o crescimento, metabolismo lipídico e integridade dos tecidos hepático, renal e do intestino delgado, em ratos. Para a reação de esterificação, 365 mmol de glicerol e 1415 mmol de ácido enântico foram misturados num balão de fundo redondo e mantidos a 10 mmHg, 130°C e agitação contínua, por 100 horas. O produto obtido foi submetido à extração por solvente e marcha química com diclorometano e carbonato de sódio a 5% e denominado óleo experimental. Os ésteres foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C (RMN ^1H e RMN ^{13}C) e por espectrometria de massas. Para o estudo biológico, 30 ratos machos da linhagem *Wistar*, recém-desmamados, foram distribuídos em 3 grupos com 10 animais cada. Um grupo recebeu a dieta controle, cuja fonte de lipídios foi o óleo de soja; um segundo grupo recebeu a dieta experimental TAGC₇ 30%, cujo conteúdo em óleo foi substituído em 30% pelo óleo experimental, e um terceiro grupo recebeu a dieta TAGC₇ 50%, cujo conteúdo em óleo foi substituído em 50% pelo óleo experimental, durante 9 meses. Os grupos foram identificados pela dieta a que estavam submetidos. Foram tomados mais 7 animais aos 10 meses de idade, com as mesmas características e procedência dos demais, para auxiliar na discussão dos achados bioquímicos e histológicos. Para a avaliação do crescimento, foram realizados ensaios de coeficiente de eficiência protéica (CEP) e coeficiente de eficiência alimentar (CEA), nos primeiros 28 dias de experimentação. Foi determinado o coeficiente de digestibilidade lipídica aparente no período de crescimento e na idade adulta dos animais. Realizou-se coleta de sangue do plexo

vascular retro-orbital para obtenção do soro dos animais, ao final do período de experimentação. Para a avaliação das funções hepática e renal e do perfil lipídico sérico foram feitas dosagens bioquímicas de AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), FA (fosfatase alcalina), γ -GT (γ -glutamyl transferase), albumina, proteínas totais, uréia, creatinina, ácido úrico, triacilgliceróis, colesterol total, HDLc (*high density lipoprotein cholesterol*), VLDLc (*very low density lipoprotein cholesterol*), LDLc (*low density lipoprotein cholesterol*), glicose e ferro. Realizaram-se exames histológicos à microscopia ótica do fígado, rim e intestino delgado. Aplicaram-se os testes estatísticos ANOVA, Tukey, Kruskal-Wallis, método das comparações múltiplas, teste para proporções, coeficiente de correlação e teste t, como teste de hipótese para correlação ($p < 0,05$). O rendimento da reação de esterificação foi de 65%. O óleo experimental era constituído por 2% do monoacilglicerol, 34% do diacilglicerol e 64% do triacilglicerol. Os dados de RMN ^1H e de ^{13}C indicaram a estrutura 1,3-dienantina para o diacilglicerol obtido. Todas as dietas foram igualmente eficazes na promoção do crescimento de ratos jovens. Na idade adulta dos animais, a digestibilidade lipídica da dieta TAGC₇ 50% foi significativamente maior que a da dieta controle ($p < 0,05$). O consumo prolongado do óleo experimental, nos níveis de substituição do óleo de soja aqui empregados, não induziu diferenças significativas nos diferentes parâmetros bioquímicos analisados, em relação ao grupo controle. Os animais dos grupos controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50% apresentaram esteatose hepática. O óleo experimental exerceu efeito hepatoprotetor, pois o grupo TAGC₇ 50% apresentou menor número de casos graves que o grupo controle ($p < 0,05$). Observou-se a presença de material hialino na luz dos túbulos renais em todos os animais, compatível com a proteinúria fisiológica da espécie. As anormalidades observadas no intestino delgado, atrofia ou hiperplasia das vilosidades em todos os segmentos e alterações inespecíficas no duodeno, apresentaram distribuição similar entre todos os grupos. Portanto, tais alterações não tiveram qualquer relação com o óleo experimental; suas causas permanecem obscuras. Os resultados permitem concluir pela ausência de efeito tóxico do óleo experimental, neste estudo, ao mesmo tempo em que contribuem para o estabelecimento do uso da trienantina na prática clínica.

ABSTRACT

Medium chain triacylglycerols (MCT), as found in milk fat and coconut and palm oil, are recommended as a source of rapidly available energy for pre- and post-surgical patients, and for those with burns, cancers or presenting disorders associated with the absorption and/or metabolism of long chain triacylglycerols. Typically, however, short and medium chain fatty acids contribute only ca. 3% of the total daily dietary intake of lipids. Synthetic MCT have been obtained from glycerol and medium chain fatty acids by esterification or trans-esterification either chemically or enzymatically. The aim of the present study was chemically to synthesize esters of glycerol with enantiic acid, and evaluate the possible toxic effects of the long term consumption of these esters on growth, lipid metabolism, and the integrity of the tissues of the liver, kidney and small intestine of rats. For the esterification reaction, glycerol (365 mmol) and enantiic acid (1415 mmol) were mixed continuously for 100h in a round bottom flask held at 130°C under vacuum (10 mmHg). The product thus obtained was alkali-refined by the addition of aqueous sodium carbonate solution (5%) followed by extraction with dichloromethane. The esters were characterized by infra-red, ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopy and mass spectrometry. The yield of the esterification reaction was 65%, and the product oil (TAGC₇) contained 2% of monoacylglycerol, 34% of diacylglycerol and 64% of triacylglycerol; NMR data indicated that the diacyl product was 1,3-dienantiin. For the biological study, 30 newly weaned male *Wistar* rats were divided into 3 groups of 10 animals. Over a 9 month period, the control group received a diet containing soya oil as lipid source, whilst the two experimental groups (TAGC₇ 30% and TAGC₇ 50%) received diets in which either 30 or 50%, respectively, of the soya oil was substituted with the oil product TAGC₇. A fourth group of 7 animals, each being 10 months old and with the same provenance and characteristics as the previous groups, was used as a further control in order to verify the biochemical and histological results. For the evaluation of growth, protein efficiency ratio and feed efficiency were determined during the first 28 days of experimentation. The coefficient of lipid digestibility was assessed during the period of growth and in the adult animals. For the evaluation of hepatic and renal function and the profile of circulating lipids, serum biochemical proofs of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, γ -glutamyl transferase, albumin, total protein, urea, creatinin, uric acid, triacylglycerides, total

cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, very low-density lipoprotein cholesterol, glucose and total iron were determined. For this purpose, blood was collected from the retro-orbital plexus at the end of the experimental period. Histological analyses of the liver, kidney and small intestine were made using the light microscope. The null hypothesis (that all diets were equal) was tested statistically at $p < 0.05$ using analyses of variance, Tukey and Kruskal-Wallis tests, method of the multiple comparisons, test for ratios, coefficients of correlation and Student's test. All diets were equally efficient in the promotion of growth in young rats, but in the adult phase the coefficient of lipid digestibility for TAGC₇ 50% diet was significantly greater than that of the control diet. Long term consumption of the experimental oil, as substituted for soya oil at the levels employed in this study, did not induce significant differences in the biochemical parameters analyzed in relation to the control group. All animals in the control and experimental groups presented some degree of liver steatosis but, since the TAGC₇ 50% group showed a smaller number of serious cases compared with the control group ($p < 0.05$). However, the experimental oil exerts a hepatoprotective effect. Hyaline-type material was observed in the lumen of the glomerular tubules in all animals, and this was compatible with the physiological proteinuria associated with this species. Abnormalities observed in the small intestine, ie atrophy or hyperplasia of the villus, and non-specific alterations in the duodenum were similarly distributed in all of the groups. Such alterations were not related to the presence of the experimental oil in the diet and their cause remains obscure. It is concluded that the long term consumption of the experimental oil, under the conditions employed in the present study, did not exert any toxic effect in rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Substitutos de gordura de origem sintética.....	21
Figura 2 - Mecanismo de entrada dos ácidos graxos no interior da mitocôndria. Enzimas carnitina aciltransferases I e II em destaque (setas).....	26
Figura 3 – Conversão do propionil-CoA a succinil-CoA.....	27
Figura 4 – Cortes histológicos do fígado corados pelo método HE. Esteatose hepática graus 0 (fígado normal), 1, 2, 3, 4 e 5, em A , B , C , D , E e F , respectivamente (10 x). Esteatose hepática grau 5 em G com pseudocistos (seta) (40 x).....	87
Figura 5 – Mecanismos envolvidos na gênese e evolução da doença do fígado gorduroso não alcoólica via estresse oxidativo.....	93
Figura 6 – Acúmulo de gordura abdominal (setas).....	94
Figura 7 – Corte histológico do rim corado pelo método HE. Presença de material eosinofílico na luz do túbulo renal (seta) em A (40 x). Parênquima renal e glomérulos (setas) normais em B (10 x).....	98
Figura 8 – Cortes histológicos do duodeno corados pelo método HE. Altura normal das vilosidades em animal do grupo TAGC ₇ 30% (seta) (A), atrofia das vilosidades em animal do grupo TAGC ₇ 50% (seta) (B) e hiperplasia das vilosidades em animal do grupo TAGC ₇ 30% (seta) (C) (4 x).....	101
Figura 9 – Cortes histológicos do jejuno corados pelo método HE. Folículo linfóide (placa de Peyer) em animal do grupo controle (seta) (A), hiperplasia de folículo linfóide (seta contínua) e numerosas células calciformes (seta tracejada) em animal do grupo TAGC ₇ 50% (B) (10 x).....	102
Figura 10 – Cortes histológicos do duodeno corados pelo método HE. Área normal (seta contínua) e adenocarcinoma (seta tracejada) em animal do grupo controle (A) e alteração inespecífica (seta) em animal do grupo TAGC ₇ 30% (B) (10 x).....	102

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Coeficiente de eficiência protéica (CEP) das dietas do grupo controle e dos grupos TAGC ₇ 30% e TAGC ₇ 50% submetidos à substituição parcial do óleo da dieta pelo óleo experimental.....	45
Gráfico 2 – Coeficiente de eficiência alimentar (CEA) das dietas do grupo controle e dos grupos TAGC ₇ 30% e TAGC ₇ 50% submetidos à substituição parcial do óleo da dieta pelo óleo experimental.....	47
Gráfico 3 – Coeficiente de digestibilidade lipídica aparente (CDLap) das dietas do grupo controle e dos grupos TAGC ₇ 30% e TAGC ₇ 50% submetidos à substituição parcial do óleo da dieta pelo óleo experimental, na fase de crescimento dos animais.....	50
Gráfico 4 – Coeficiente de digestibilidade lipídica aparente (CDLap) das dietas do grupo controle e dos grupos TAGC ₇ 30% e TAGC ₇ 50% submetidos à substituição parcial do óleo da dieta pelo óleo experimental, na idade adulta dos animais.....	51
Gráfico 5 – Correlações entre AST e graus de esteatose hepática, relação peso do fígado/peso corporal e peso corporal (A , C e E , respectivamente) e entre ALT e graus de esteatose hepática, relação peso do fígado/peso corporal e peso corporal (B , D e F , respectivamente), no conjunto dos animais dos grupos controle, TAGC ₇ 30%, TAGC ₇ 50% e controle dois.....	58
Gráfico 6 - Correlações entre relação peso do fígado/peso corporal e graus de esteatose hepática (A), peso corporal e graus de esteatose hepática (B) e peso corporal e relação peso do fígado/peso corporal (C), no conjunto dos animais dos grupos controle, TAGC ₇ 30%, TAGC ₇ 50% e controle dois.....	59
Gráfico 7 – Peso corporal dos animais dos grupos controle, TAGC ₇ 30%, TAGC ₇ 50% e controle dois, aos dez meses de idade.....	60
Gráfico 8 – Correlações entre fosfatase alcalina e graus de esteatose hepática (A) e fosfatase alcalina e relação peso do fígado/peso corporal (B) no conjunto dos animais dos grupos controle, TAGC ₇ 30%, TAGC ₇ 50% e controle dois.....	62
Gráfico 9 – Correlações entre os níveis séricos de colesterol total e HDLc (A) e de triacilgliceróis e HDLc (B), no conjunto dos animais dos grupos controle, TAGC ₇ 30%, TAGC ₇ 50% e controle dois.....	82
Gráfico 10 – Correlações entre níveis séricos de glicose e peso corporal (A), graus de esteatose hepática (B) e relação peso do fígado/peso corporal (C), no conjunto dos animais dos grupos controle, TAGC ₇ 30%, TAGC ₇ 50% e controle dois.....	84

Gráfico 11 - Relação peso do fígado/peso corporal dos animais dos grupos controle, TAGC ₇ 30%, TAGC ₇ 50% e controle dois.....	95
Gráfico 12 - Teor de lipídios hepáticos totais (% do peso do órgão) dos animais dos grupos controle, TAGC ₇ 30%, TAGC ₇ 50% e controle dois.....	95
Gráfico 13 – Correlação entre relação peso do fígado/peso corporal e teor de lipídios hepáticos totais (% do peso do órgão), no conjunto dos animais dos grupos controle, TAGC ₇ 30%, TAGC ₇ 50% e controle dois.....	96

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Composição das dietas controle, TAGC ₇ 30% e TAGC ₇ 50%, baseadas nas dietas AIN-93 G (G) (para o crescimento) e AIN-93 M (M) (para a idade adulta).....	33
Quadro 2 – Mistura mineral utilizada nas dietas controle, TAGC ₇ 30% e TAGC ₇ 50% no período de crescimento (AIN-93 G) e na idade adulta (AIN-93 M) dos animais.....	34
Quadro 3 – Mistura vitamínica utilizada nas dietas controle, TAGC ₇ 30% e TAGC ₇ 50%.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- AGCC** – Ácidos graxos de cadeia curta
- AGCL** – Ácidos graxos de cadeia longa
- AGCM** – Ácidos graxos de cadeia média
- AGL** – Ácidos graxos livres
- AGMI** – Ácidos graxos monoinsaturados
- AGPI** – Ácidos graxos polinsaturados
- AGS** – Ácidos graxos saturados
- AIN** – *American Institute of Nutrition*
- ALT** – Alanina aminotransferase
- apo** – Apolipoproteínas
- AST** – Aspartato aminotransferase
- bl** – banda larga
- CCD** – Cromatografia em camada delgada
- CEA** – Coeficiente de eficiência alimentar
- CEP** – Coeficiente de eficiência protéica
- CEPop** – Coeficiente de eficiência protéica operacional
- CGEM** – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
- Dap** – Digestibilidade lipídica aparente
- d** – Duplete
- dd** – Duplo duplete
- DHA** – Ácido docosaexaenóico
- EHNA** – Esteato-hepatite não alcoólica
- EPA** – Ácido eicosapentaenóico

eV – Elétron-volts

FA – Fosfatase alcalina

FAO – *Food and Agricultural Organization*

FID – Detector de ionização de chama

FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

GRAS – *General Recognition of an Additive's Safety*

GSH – Glutation reduzido

γ-GT – Gama-glutamil transferase

HDLc – *High density lipoprotein cholesterol*

HE – Hematoxilina-eosina

HMG-CoA – Hidroxi-metil-glutaril-CoA

IDL – *Intermediary density lipoprotein*

IKKβ - Inibidor Kappa beta quinase

IVTF – Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

J – *Constante de acoplamento*

LCAT – Lecitina-colesterol aciltransferase

LDLc – *Low density lipoprotein cholesterol*

m – Multiplete

[m ± s(m)] - Média ± erro padrão da média

MHz – Megahertz

m/z – Relação massa/carga

OMS – Organização Mundial da Saúde

PPi – Fosfato inorgânico

q – Quinteto

RDA – *Recommended Dietary Allowances*

RMN ¹³C – Ressonância magnética nuclear de ¹³C

RMN ¹H – Ressonância magnética nuclear de ¹H

SBAN – Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição

TAGC7 30% e 50% - Grupos experimentais submetidos à substituição parcial do óleo da dieta pelo óleo experimental

TCM – Triacilgliceróis de cadeia média

TCL – Triacilgliceróis de cadeia longa

t – Tripleto

TNF α - Fator alfa de necrose tumoral

U/L – Unidades por litro

UI/L – Unidades Internacionais por litro

UNU – Universidade das Nações Unidas

VET – Valor energético total da dieta

VLDLc – *Very low density lipoprotein cholesterol*

δ - Deslocamento químico

ω -3 – Ácidos graxos polinsaturados da série ω -3

ω -6 – Ácidos graxos polinsaturados da série ω -6

Para os ácidos carboxílicos:

7:0 – Ácido graxo enântico

8:0 – Ácido graxo caprílico

10:0 – Ácido graxo cáprico

12:0 – Ácido graxo láurico

14:0 – Ácido graxo mirístico

16:0 – Ácido graxo palmítico

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1 INTRODUÇÃO	19
2 MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 Reagentes e solventes	29
2.2 Reação de esterificação entre o glicerol e o ácido enântico	29
2.3 Cromatografia gasosa e técnicas espectroscópicas	31
2.3.1 Cromatografia gasosa	31
2.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)	31
2.3.3 Ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C (RMN ^1H e RMN ^{13}C)	31
2.3.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CGEM)	32
2.4 Preparação das dietas	32
2.4.1 Dieta controle	32
2.4.2 Dietas experimentais	33
2.5 Animais estudados	35
2.5.1 Grupo controle	36
2.5.2 Grupos experimentais	37
2.5.3 Grupo controle dois	37
2.6 Estudo do impacto do consumo das dietas controle e experimentais sobre a saúde dos animais	37
2.6.1 Avaliação do crescimento	37
2.6.2 Coeficiente de digestibilidade lipídica	38
2.6.3 Análises bioquímicas	39
2.6.4 Sacrifício, dissecação e tratamento dos órgãos dos animais	40
2.6.5 Análise histológica do fígado, rim e intestino delgado	40
2.6.6 Determinação dos teores de lipídios totais do fígado	41

2.7 Análise estatística	41
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1 Reação de esterificação entre o glicerol e o ácido enântico	42
3.2 Avaliação do crescimento dos animais	44
3.3 Coeficiente de digestibilidade lipídica aparente	49
3.4 Análises bioquímicas	52
3.4.1 Marcadores de lesão e provas de função hepática	52
3.4.2 Provas de função renal	68
3.4.3 Perfil lipídico	72
3.4.4 Outros parâmetros bioquímicos	83
3.5 Análise histológica do fígado	85
3.6 Análise histológica do rim	97
3.7 Análise histológica do intestino delgado	99
4 CONCLUSÕES	105
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
6 APÊNDICES	113

1 INTRODUÇÃO

Os lipídios constituem um grupo de diferentes compostos orgânicos que têm em comum o fato de não serem solúveis em água. A palavra lipídio é derivada do grego *lipos* que significa gordura. Do ponto de vista químico, a definição relaciona-se com a sua solubilidade em solventes orgânicos como o éter ou o clorofórmio (GRAZIOLA; SOLIS; CURI, 2002).

Os triacilgliceróis ou triglicerídios representam cerca de 90% dos lipídios dietéticos e constituem a maior forma de estoque de energia metabólica nos seres humanos. O metabolismo oxidativo das gorduras rende cerca de duas vezes mais energia que igual peso de carboidratos ou proteínas secos. Eles são sintetizados no organismo a partir de ésteres de acil-CoA e glicerol-3-fosfato ou fosfato de diidroxiacetona (VOET; VOET, 1995).

Ao lado dos triacilgliceróis outros compostos de natureza lipídica desempenham importantes papéis na estrutura e metabolismo celulares. Entre eles estão: o colesterol, precursor dos hormônios esteróides e dos ácidos biliares, o ácido araquidônico, um ácido graxo insaturado que serve como precursor das prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos, potentes mediadores intercelulares que controlam uma variedade de processos complexos, e os glicolipídios e fosfolipídios, os maiores componentes das membranas biológicas (VOET; VOET, 1995).

Além da sua alta densidade energética, os lipídios promovem sensação de saciedade, contribuem com a aparência, textura, aroma, sabor, estabilidade térmica, lubrificação, emulsificação e aeração dos alimentos e são veículos de vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos essenciais.

Entretanto, o consumo excessivo de tais substâncias está associado a diversos distúrbios, como a obesidade e suas complicações (intolerância aos hidratos de carbono ou diabetes melito não insulino-dependente, dislipidemias, hipertensão e aterosclerose), diversos tipos de câncer e enfermidades cardiovasculares (OMS, 1990). O colesterol dietético e, especialmente, os ácidos graxos saturados tendem a aumentar as concentrações sanguíneas de colesterol e a incidência de cardiopatia coronariana.

De um modo geral, o sobrepeso e a obesidade estão relacionados ao aumento da proporção de gorduras e açúcares da dieta e à redução do consumo de

carboidratos complexos e fibras, associados a um estilo de vida sedentário (SARTORELLI; FRANCO, 2003). As influências genéticas, o estilo de vida, o número de gestações e o estado nutricional prévio, também devem ser considerados.

Preocupados com as repercussões do consumo excessivo de lipídios sobre a saúde pública, organismos nacionais e internacionais recomendam a redução da ingestão diária para 15 a 20% e 25 a 30% do valor energético total da dieta (VET), para os consumos mínimo e máximo, respectivamente (FAO/OMS/UNU, 1985; OMS, 1990; FNB/RDA, 1989; SBAN, 1990). O consumo de lipídios saturados deve ser limitado a 10% do VET e o de colesterol a, no máximo, 300mg/dia.

Apesar disso, há grande resistência da população ocidental em reduzir o consumo de lipídios dos atuais 40 - 45% do VET, em média, a depender da localização geográfica, hábitos e fatores sócio-econômicos (LIMA; NASSU, 1996), em função de suas características organolépticas, principalmente o sabor. Entretanto, tem sido observada uma redução do consumo de lipídios saturados substituídos pelos polinsaturados, de origem vegetal, o que pode representar uma preocupação em reduzir os riscos associados à ingestão excessiva de gorduras. De fato, tem havido um crescente interesse da população no consumo de alimentos formulados de maneira que apresentem baixo teor de gorduras, mas com as mesmas características sensoriais dos produtos originais (LIMA; NASSU, 1996).

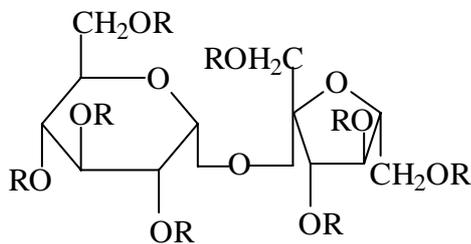
A partir dessas considerações, pesquisadores e indústrias têm focalizado atenção no desenvolvimento de alimentos sem lipídios, com teor reduzido de lipídios ou com imitadores de lipídios, especialmente voltados ao controle da ingestão total de lipídios e calorias da dieta, numa tentativa de atender à demanda do consumidor por alimentos mais saudáveis.

O conteúdo de lipídios de um alimento pode ser diminuído substituindo-os total ou parcialmente por um outro componente menos energético, que apresente todos os seus atributos, especialmente as propriedades organolépticas, difíceis de serem reproduzidas em formulações de alimentos sem a adição de lipídios (AKOH, 1995).

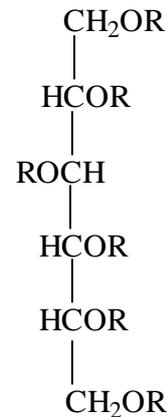
Nesse sentido, vários substitutos de lipídios ou de gorduras, como são mais comumente referidos, têm sido desenvolvidos (figura 1). O termo substituto de gordura pode ser atribuído a uma substância usada na alimentação humana em substituição aos lipídios tradicionais contidos num alimento, que encerre certas propriedades físicas ou organolépticas desejáveis dos lipídios que está substituindo,

sem apresentar uma ou mais de suas propriedades indesejáveis (VANDERVEEN; GLINSMANN, 1992). Eles podem ser usados em produtos lácteos, bebidas, sorvetes, doces, óleos, sobremesas, batatas fritas, aperitivos, molhos e maioneses, dentre outros.

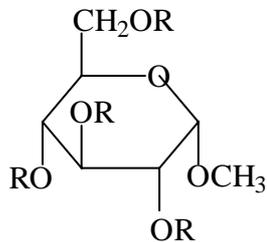
De acordo com o *Calorie Control Council* (1994), o substituto de gordura ideal deve ser um composto de reconhecida segurança para a saúde e que apresente todas as propriedades funcionais e organolépticas das gorduras, com redução calórica significativa.



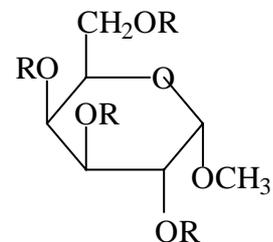
Poliéster de sacarose



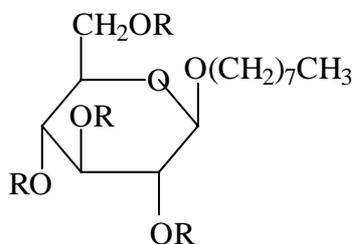
Poliéster de sorbitol



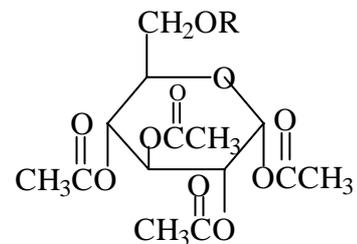
Poliéster de metil glicosídeo



Poliéster de metil galactosídeo



Poliéster de octil-β-glicosídeo



Éster de ácido graxo de tetracetilglicose

Figura 1 – Substitutos de gordura de origem sintética. R = grupo acila de ácido graxo de cadeia longa. Fonte: Akok, 1995.

Para a avaliação da segurança e dos efeitos sobre a saúde do uso de substitutos de gordura, o *Food and Drug Administration* (FDA), um órgão do *Department of Health and Human Services* dos Estados Unidos, considera a origem da substância e o seu grau de processamento. Cada produto deve ser avaliado de acordo com a sua química, metabolismo e estabilidade durante o processamento e estoque. Para essa discussão, os substitutos de gordura são agrupados em: 1. Derivados de fontes alimentares tradicionais, 2. Produzidos através de síntese química e, 3. Derivados de novas fontes alimentares (VANDERVEEN; GLINSMANN, 1992). A obtenção do substituto de gordura pode envolver a aplicação de tecnologias conhecidas e bem estabelecidas ou de novos processos tecnológicos.

Para conceder a liberação do produto para o consumo humano e reconhecê-lo como GRAS (*General Recognition of an Additive's Safety*), o FDA considera resultados de testes com animais e humanos, envolvendo estudos do metabolismo, absorção, toxicidade crônica, mutagenicidade, carcinogenicidade, toxicidade reprodutiva, segurança para o trato gastrointestinal, nutrição e o potencial para interferir com a absorção de drogas e nutrientes (CÂNDIDO; CAMPOS, 1996). Entretanto, devem ser consideradas a natureza química e as propriedades do composto em estudo para se estabelecer um programa de avaliação de segurança, onde será definida a importância de uma avaliação toxicológica mais detalhada (MUNRO, 1990).

Baseado nos conhecimentos atualmente disponíveis parece razoável aceitar o uso de substitutos de gordura como coadjuvante no controle da ingestão de lipídios. Entretanto, tal intervenção não pode substituir um estilo de vida saudável, incluindo o consumo de uma dieta equilibrada, que promova a manutenção do peso apropriado e garanta o consumo dos nutrientes essenciais nas quantidades e proporções necessárias, e a prática regular de exercício físico.

Existem outras categorias de substitutos de gordura da dieta voltados para fins especiais, a exemplo dos triacilgliceróis de cadeia média (TCM). Os TCM são constituídos por ácidos graxos saturados de seis a doze átomos de carbono e têm valor calórico médio de 8,3 Kcal/g. São precursores de um outro grupo de lipídios, denominados lipídios estruturados, triacilgliceróis constituídos de misturas de ácidos graxos de cadeia curta e/ou média e ácidos graxos de cadeia longa, preferivelmente esterificados sobre a mesma molécula de glicerol (FOMUSO; AKOH, 1997).

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) ($C_2 - C_4$) e de cadeia média (AGCM) ($C_6 - C_{12}$) são mais solúveis em água que os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) ($C_{14} - C_{20}$) ou extralonga ($\geq C_{22}$). Os de cadeia curta são voláteis e mais rapidamente absorvidos no estômago que os de cadeia média, pois são mais solúveis em água, têm menor peso molecular e cadeia carbônica mais curta. Por essa razão, eles servem como fonte preferencial de energia para as células da mucosa gástrica. Baseado no calor de combustão, os ácidos graxos de cadeia curta fornecem menos calorias por unidade de peso que os ácidos graxos de cadeia média, longa ou extralonga. O butirato fornece 6Kcal/g, o caproato cerca de 7Kcal/g e ácidos graxos de cadeias mais longas, aproximadamente 9Kcal/g (FOMUSO; AKOH, 1997).

Os TCM não necessitam da lipase pancreática e de sais biliares para a sua digestão e absorção intestinais; não são incorporados aos quilomicrons, portanto apresentam clareamento plasmático mais rápido; quando ativados na mitocôndria não necessitam do transporte da carnitina; destinam-se principalmente à β -oxidação; formam corpos cetônicos para oxidação nos tecidos periféricos e não são armazenados no fígado ou no tecido adiposo (WAITZBERG; BORGES, 2000).

Por tais razões, os TCM são recomendados para indivíduos com disfunções da absorção de lipídios, especialmente aqueles que não podem consumir triacilgliceróis de cadeia longa ou extralonga. O óleo de coco, que apresenta altas concentrações de ácidos graxos caprílico (8:0) e cáprico (10:0), tem sido indicado para o tratamento de desordens da absorção de lipídios há cerca de 40 anos (CÂNDIDO; CAMPOS, 1996).

Eles são utilizados amplamente em nutrição enteral e parenteral. As dietas formuladas encerram, em sua maioria, de 20% a 50% de seus lipídios como TCM. Dadas as suas características metabólicas especiais, os TCM são indicados como coadjuvantes no tratamento das desordens digestivas ou absorptivas, nos distúrbios do transporte linfático, na abetalipoproteinemia, no estresse cirúrgico, no câncer, na desnutrição e em outros quadros de imunossupressão. Além do uso em alimentos e fórmulas especiais são empregados nas indústrias farmacêutica e cosmética (HILL et al., 1990; TRAU et al., 2000; WAITZBERG; BORGES, 2000).

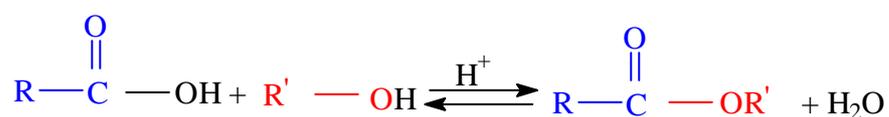
Os TCM são encontrados na gordura do leite e nos óleos de coco e palma. Ácidos graxos de cadeia curta e média contribuem com aproximadamente 3% da ingestão total diária de lipídios dietéticos (FOMUSO; AKOH, 1997). No entanto, em

função do aumento da demanda na prática clínica e da baixa concentração nas fontes naturais, tem crescido o interesse na síntese desses compostos.

A síntese de TCM tem sido desenvolvida a partir do glicerol e de ácidos graxos de cadeia média, em reações de esterificação ou interesterificação química ou enzimática (KIM; RHEE, 1991; SELMI et al., 1997).

As reações de esterificação química são catalisadas por ácidos inorgânicos. Elas se processam muito lentamente na ausência de ácidos fortes, mas alcançam o equilíbrio em poucas horas, quando se utiliza uma pequena quantidade de ácido sulfúrico concentrado ou ácido clorídrico (SOLOMONS, 1996).

Reação de esterificação:



O uso da maioria dos catalisadores químicos tem resultado em produtos de cor escura, além de gerar problemas durante o refinamento do produto bruto (GREWAL; RAMAMURTHI; MCCURDY, 1993). A síntese química de triacilgliceróis sem catalisador, no entanto, requer o emprego de condições mais severas.

Um excesso do ácido carboxílico ou do álcool aumenta o rendimento baseado no reagente limitante. O rendimento dessas reações também pode ser incrementado pela remoção da água da mistura reacional, à medida que é formada (SOLOMONS, 1996).

Ao contrário da esterificação química, a síntese enzimática de ésteres se processa em condições brandas. As lipases são catalisadores de grande utilidade para a síntese de glicerídios, pois possuem alta especificidade e alta atividade a temperaturas relativamente baixas. Por essas razões, os produtos sintetizados através da catálise enzimática são livres dos subprodutos gerados pelas altas temperaturas e pela presença de catalisadores inorgânicos, freqüentemente utilizados nos processos químicos (McNEILL; SONNET, 1995). Uma outra vantagem do uso de catalisador enzimático é que os ésteres assim sintetizados podem ser qualificados como ingredientes naturais (VAN DER PADT; SEWALT; VAN'T RIET, 1993).

Muitas são as questões a serem consideradas na síntese de glicerídios, especialmente aqueles de aplicação potencial na indústria alimentar. A natureza da reação, o uso de catalisadores químicos ou enzimáticos e a adição de solventes ao meio reacional são algumas delas. Meios reacionais compostos apenas pelos reagentes apresentam a vantagem de eliminar o uso de substâncias tóxicas e permitir a recuperação do produto sem passos de purificação mais elaborados. Alguns resultados interessantes têm sido obtidos nessas condições (ERGAN; TRANI; ANDRÉ, 1991; GREWAL; RAMAMURTHI; MCCURDY, 1993; SELMI et al., 1997).

A trienantina ou trieptanoína, um TCM constituído por três moléculas do ácido graxo enântico (heptanóico; 7:0), tem recebido atenção especial recentemente. Por apresentar uma característica incomum à maioria dos TCM, ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono, foi testada no tratamento dietoterápico das desordens metabólicas da oxidação de ácidos graxos de cadeia longa (ROE et al., 2002).

Desde a identificação da deficiência da enzima carnitina palmitoiltransferase, presente no interior das mitocôndrias (figura 2), há mais de vinte e cinco anos, quase todas as etapas enzimáticas nos processos da β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos saturados e insaturados têm sido associadas com uma desordem metabólica hereditária. As conseqüências clínicas dessas desordens estão relacionadas ao prejuízo da oxidação dos AGCL e a sua utilização como fonte de energia. Elas variam desde a ausência de sintomas até manifestações severas que incluem cardiomiopatias agudas e crônicas, rbdomiólise, hipoglicemia, neuropatia periférica, hipotonia e morte súbita (ROE et al., 2002).

Os TCM com número par de átomos de carbono são tradicionalmente utilizados em tais desordens, porém não têm sido suficientes para evitar os quadros de cardiomiopatia e rbdomiólise. Por esta razão, o grupo de Roe et al. (2002) testou a trienantina em crianças portadoras desses males. Além de ser constituída por AGCM e, portanto, prescindir do transporte da carnitina, oferece na última volta da β -oxidação, acetil-CoA e propionil-CoA. A este último composto é conferida propriedade anaplerótica, ou seja, de reposição de intermediários metabólicos. Ele é convertido a succinil-CoA (figura 3), um intermediário do ciclo de Krebs. Uma vez que tais intermediários são constantemente utilizados como precursores em muitas vias biossintéticas (cataplerose), o balanço entre a anaplerose e a cataplerose nos

portadores das desordens hereditárias da oxidação de AGCL está prejudicado. Daí, a oferta de compostos anapleróticos é recomendada.

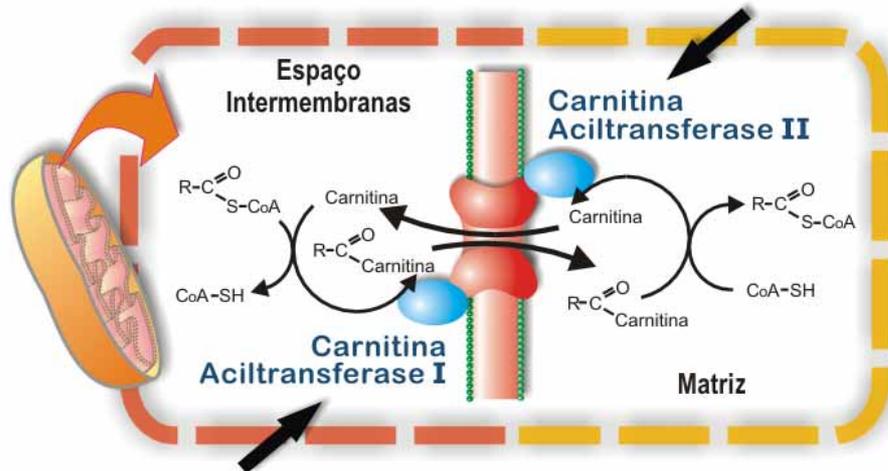


Figura 2 - Mecanismo de entrada dos ácidos graxos no interior da mitocôndria. Enzimas carnitina aciltransferases I e II em destaque (setas). Fonte: Leningher, Nelson e Cox, 2000.

Os autores observaram melhora clínica em três crianças portadoras de deficiência da enzima acil-CoA desidrogenase de ácidos graxos de cadeia extralonga, com o consumo de dietas contendo 30% de suas calorias na forma de trienantina. As crianças apresentaram resposta rápida ao tratamento com desaparecimento da cardiomiopatia crônica, da rabdomiólise e da fraqueza muscular.

No entanto, ainda não se dispõe de dados na literatura sobre os efeitos do consumo crônico da trienantina e dos produtos de sua digestão em estudos experimentais que possam assegurar o consumo humano por tempo indeterminado. Os relatos disponíveis estão restritos ao uso na indústria cosmética. Neste caso, foram considerados seguros cerca de vinte e três triacilgliceróis, inclusive a trienantina (COSMETIC INGREDIENT REVIEW, 2001).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, muitos efeitos farmacodinâmicos observados experimentalmente podem ser extrapolados para o homem. Por essa razão, são empregados testes toxicológicos em larga escala para determinação da toxicidade e segurança das drogas (ARAÚJO, 2002). Tais considerações também

podem ser feitas em relação aos alimentos, especialmente aqueles produzidos sinteticamente ou através da manipulação genética.

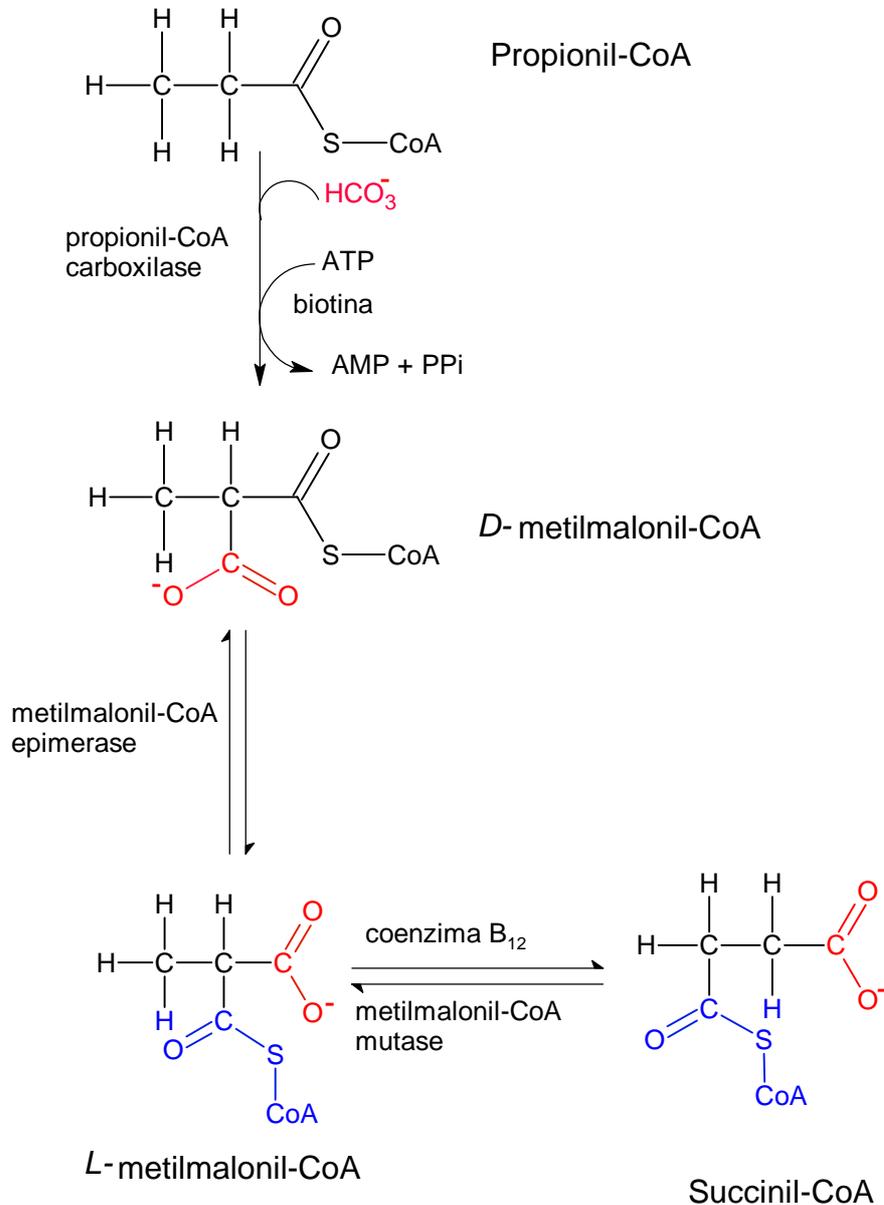


Figura 3 – Conversão do propionil-CoA a succinil-CoA. Fonte: Leningher, Nelson e Cox, 2000.

Nos testes de toxicidade crônica procura-se investigar a toxicidade potencial da substância durante longo período de tempo, a depender da duração prevista para uso na espécie humana. Para o consumo por mais de quatro semanas, o período mínimo do estudo deve ser de vinte e seis semanas, além dos testes de carcinogênese. Deve-se estar atento para a ocorrência de lesões reversíveis ou

irreversíveis e os sistemas orgânicos afetados pela substância em estudo (ARAÚJO, 2002). De um modo geral, estudos crônicos com ratos têm duração mínima de seis meses, podendo se prolongar por toda a vida do animal (BRIGGS; OEHME, 1979).

O fígado pode ser facilmente lesado porque é o sítio do metabolismo e da degradação de drogas e nutrientes. Quase todos os efeitos hepatotóxicos resultam em necrose hepática, mas podem ser observadas doenças venoclusivas, fibrose, esteatose, colestase ou lesões mistas (ARAÚJO, 2002).

Os ratos são modelos experimentais muito usados na avaliação hepatóxica de vários compostos. O exame histopatológico é o teste mais sensível na detecção de dano hepático crônico nesses animais. No entanto, para a avaliação da ação tóxica de uma substância o espectro de tecidos analisados deve ser o mais amplo possível. Nesse caso, os indicadores mais comumente utilizados no estudo com ratos são: redução do peso corporal, detecção de acúmulo de gordura e mudanças no peso dos órgãos, anormalidades histológicas e aumento da mortalidade (RINGLER; DABICH, 1979).

Dada a aplicação clínica dos TCM e a sua baixa concentração nas fontes alimentares naturais, em particular daqueles com número ímpar de átomos de carbono, buscou-se sintetizar ésteres do glicerol com o ácido graxo enântico, por via química. Por se tratarem de compostos novos, ainda não submetidos a testes toxicológicos que assegurem o consumo humano, desenvolveu-se também um estudo para avaliar o potencial tóxico do consumo crônico desses ésteres sobre o crescimento, metabolismo lipídico e integridade dos tecidos hepático, renal e do intestino delgado, em ratos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes e solventes

Todos os reagentes utilizados foram de grau PA das marcas Aldrich (Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WIS, USA), Sigma (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) e VETEC (VETEC Química Fina Ltda., Rio de Janeiro). Os solventes deuterados foram adquiridos da Aldrich. Todos os demais solventes utilizados (grau comercial) foram adquiridos da Rhodia (embalados e comercializados por Moraes de Castro & Cia. Ltda., Jaboatão dos Guararapes, PE) e previamente destilados no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

2.2 Reação de esterificação entre o glicerol e o ácido enântico

Glicerol (365 mmol, 33,6 g) e ácido enântico (1415 mmol, 184 g) foram misturados num balão de fundo redondo de 500 mL, submetidos à pressão reduzida (10 mmHg), agitação contínua e aquecimento gradativo em banho de óleo, até alcançar a temperatura de 130°C, por 100 horas. A reação era interrompida por resfriamento do meio reacional à temperatura ambiente, antes de desligar a bomba de vácuo. O procedimento, baseado no trabalho de Grewal, Ramamurthi e McCurdy (1993), foi repetido várias vezes até a obtenção do volume de óleo necessário à elaboração das dietas experimentais, descritas no item 2.4.2.

A evolução da reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), em placas de gel de sílica embebidas em ácido bórico a 5%, eluídas com hexano:clorofórmio (1:1), contra padrão sintetizado previamente em condições reacionais similares (ATAIDE, 1999). Utilizou-se solução de ácido fosfomolibídico em etanol a 12,5% como revelador.

O produto reacional foi submetido à extração por solvente e marcha química. Num funil de separação foram colocados o produto reacional bruto,

diclorometano (200 mL) e solução de carbonato de sódio a 5% (200 mL). A mistura foi agitada e, após a separação das fases, a fase aquosa foi desprezada. A fase orgânica foi submetida ao mesmo tratamento por mais duas vezes. A fase orgânica resultante foi lavada com água destilada (3 x 200 mL), seca com sulfato de magnésio e submetida à CCD, para confirmação da ausência de ácido enântico residual. Na seqüência, procedeu-se a evaporação do solvente à pressão reduzida, para a obtenção do produto reacional pré-purificado.

Do produto reacional pré-purificado foi retirada uma alíquota para cromatografia em coluna de gel de sílica (gel de sílica 60 para cromatografia em coluna, tamanho da partícula 0,063 – 0,200 mm, malha 70 – 230 ASTM, Merck, Darmstadt, Alemanha) com hexano:clorofórmio (1:1) como eluente. A proporção entre os ésteres obtidos foi determinada por cromatografia gasosa, descrita no item 2.3.1.

O rendimento de acilação foi de 65%. O produto reacional foi constituído por 2% do monoacilglicerol, 34% do diacilglicerol e 64% do triacilglicerol. A di- e a trienantina (principais produtos reacionais) foram caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF), por ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C (RMN ^1H e RMN ^{13}C) e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CGEM), descritas nos itens 2.3.2, 2.3.3 e 2.3.4, respectivamente.

1,3-dienantina: $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_5$; óleo transparente; CCD Rf 0,21 (hexano:clorofórmio, 1:1); IVTF (NaCl, $\nu \text{ cm}^{-1}$) 3463, 2956, 2930, 2859, 2362, 1741, 1458, 1419, 1379, 1234, 1167, 1104, 1028, 722; RMN ^1H e RMN ^{13}C (ver item 3.1) ; CGEM m/z (intensidade relativa %): 316 (0), 299 (5), 187 (15), 113 (100), 85 (35), 57 (35).

Trienantina: $\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{O}_6$; óleo transparente; CCD Rf 0,55 (hexano:clorofórmio, 1:1); IVTF (NaCl, $\nu \text{ cm}^{-1}$) 2930, 2859, 1744, 1459, 1419, 1378, 1232, 1162, 1102; RMN ^1H e RMN ^{13}C (ver item 3.1); CGEM m/z (intensidade relativa %): 428 (0), 299 (15), 229 (5), 186 (10), 159 (5), 116 (5), 113 (100), 85 (30).

Para efeito das discussões posteriores, adotou-se a denominação “óleo experimental” para a mistura de ésteres obtida na reação de esterificação entre o glicerol e o ácido enântico.

2.3 Cromatografia gasosa e técnicas espectroscópicas

2.3.1 Cromatografia gasosa

Para a determinação da proporção entre os ésteres obtidos na reação de esterificação entre o glicerol e o ácido enântico, realizou-se cromatografia gasosa em cromatógrafo a gás Hewlett-Packard (Agilent; Palo Alto, CA, USA), modelo HP 4890 D, coluna HP 5 (15 m x 0,53 mm; filme 1,5 μm), H_2 como gás de arraste num fluxo de 12,5 mL min^{-1} e detector FID. A temperatura inicial foi de 180°C, durante um minuto, com aumentos progressivos de 10°C min^{-1} até alcançar 260°C. A temperatura do injetor e do detector foi mantida em 280°C.

2.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

O espectro na região do infravermelho com transformada de Fourier foi obtido num espectrômetro Perkin-Elmer (Boston, MA, USA), modelo FTIR 1600, em pastilhas de NaCl.

2.3.3 Ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C (RMN ^1H e RMN ^{13}C)

Os experimentos de RMN ^1H e RMN ^{13}C foram realizados em solução de CDCl_3 a 300 K (15 mg mL^{-1}), em aparelho Bruker (Ettlingen, Alemanha), modelo Advance 300 instrument a 300 MHz para RMN ^1H e 75 MHz para RMN ^{13}C .

2.3.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CGEM)

Utilizou-se um cromatógrafo a gás Hewlett-Packard (Agilent; Palo Alto, CA, USA), modelo 5890 série II, equipado com uma coluna HP 1 ou HP 5 e detector FID. H₂ foi usado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL min⁻¹. A temperatura inicial foi de 60°C, com incrementos de 10°C min⁻¹ até atingir 275°C. A temperatura do injetor foi mantida a 250°C. A espectrometria de massas foi determinada a 70 eV em aparelho Finnigan (San Jose, CA, USA), modelo TSQ 70, acoplado ao cromatógrafo gasoso.

2.4 Preparação das dietas

2.4.1 Dieta controle

Utilizou-se a dieta controle AIN-93 (adaptada de REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) nas versões G (*growth*), do desmame ao final do segundo mês de vida dos animais (fase de crescimento), e M (*maintenance*), do terceiro ao décimo mês de vida (idade adulta) (quadros 1, 2 e 3). A adaptação da dieta original foi restrita à substituição do seu teor em sacarose (10%) por amido de milho.

O óleo de soja e o amido de milho foram adquiridos no comércio local. Os demais ingredientes foram fornecidos por RHOSTER Indústria e Comércio Ltda., São Paulo.

A dieta foi elaborada no Laboratório de Técnica Dietética do Departamento de Nutrição da UFAL. Os ingredientes foram misturados nas proporções indicadas, de modo a garantir homogeneidade à mistura. Acrescentou-se água destilada à mistura dos ingredientes para formar uma massa homogênea que, em seguida, foi cortada e seca em estufa de circulação de ar a 60°C, por 24 horas. A dieta foi oferecida sob a forma de *pellets*, após um período máximo de 15 dias de armazenamento sob refrigeração.

INGREDIENTES (g/Kg)	DIETAS					
	CONTROLE		TAGC ₇ 30%		TAGC ₇ 50%	
	G	M	G	M	G	M
Caseína	200	140	200	140	200	140
Amido de milho Maizena®	497,50	565,70	497,50	565,70	497,50	565,70
Amido dextrinizado	132	155	132	155	132	155
Óleo de soja LIZA	70	40	49	28	35	20
Óleo experimental	-	-	21	12	35	20
Celulose microcristalina	50	50	50	50	50	50
Mistura mineral AIN-93 G	35	-	35	-	35	-
Mistura mineral AIN-93 M	-	35	-	35	-	35
Mistura vitamínica	10	10	10	10	10	10
L-cistina	3	1,8	3	1,8	3	1,8
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
t-butilidroquinona	0,014	0,008	0,014	0,008	0,014	0,008
Ácido graxo ω -6 adicionado ^a	-	-	3,6	0,84	6	4,08
Ácido graxo ω -3 adicionado ^a	-	-	0,6	0,14	1	0,68

Quadro 1 – Composição das dietas controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50%, baseadas nas dietas AIN-93 G (G) (para o crescimento) e AIN-93 M (M) (para a idade adulta) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). ^a Quantidade adicionada de ácidos graxos das séries ω -6 e ω -3 às dietas experimentais.

2.4.2 Dietas experimentais

As dietas experimentais foram elaboradas do mesmo modo que a dieta controle, descrita no item anterior, com alterações na composição lipídica (quadros 1, 2 e 3). O conteúdo de óleo de soja foi parcialmente substituído pelo óleo experimental, cuja síntese está descrita no item 2.2. Foram adotados os percentuais de substituição de 30% e 50% (freqüentemente encontrados na prática clínica), para a elaboração das dietas experimentais TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50%, respectivamente. A dieta AIN-93 G foi tomada como referência para a elaboração das dietas experimentais do desmame até o final do segundo mês de

vida dos animais dos grupos experimentais (fase de crescimento) e a dieta AIN-93 M, do terceiro até o décimo mês de vida desses animais (idade adulta).

INGREDIENTES	MISTURA MINERAL AIN-93 G	MISTURA MINERAL AIN-93 M
Carbonato de cálcio anidro (g/Kg)	357	357
Fosfato de potássio monobásico (g/Kg)	196	250
Citrato de potássio (g/Kg)	70,78	28
Cloreto de sódio (g/Kg)	74	74
Sulfato de potássio (g/Kg)	46,60	46,60
Óxido de magnésio (g/Kg)	24	24
Citrato férrico (g/Kg)	6,06	6,06
Carbonato de zinco (g/Kg)	1,65	1,65
Meta-silicato de sódio.9H₂O (g/Kg)	1,45	1,45
Carbonato manganoso (g/Kg)	0,63	0,63
Carbonato cúprico (g/Kg)	0,30	0,30
Sulfato de potássio crômico.12H₂O (g/Kg)	0,275	0,275
Ácido bórico (mg/Kg)	81,5	81,5
Fluoreto de sódio (mg/Kg)	63,5	63,5
Carbonato de níquel (mg/Kg)	31,8	31,8
Cloreto de lítio (mg/Kg)	17,4	17,4
Selenato de sódio anidro (mg/Kg)	10,25	10,25
Iodeto de potássio (mg/Kg)	10	10
Paramolibdato de amônio.4H₂O (mg/Kg)	7,95	7,95
Vanadato de amônio (mg/Kg)	6,6	6,6
Sacarose em pó (g/Kg)	221,026	209,806

Quadro 2 – Mistura mineral utilizada nas dietas controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50% no período de crescimento (AIN-93 G) e na idade adulta (AIN-93 M) dos animais (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

As dietas experimentais foram suplementadas com ácidos graxos polinsaturados, através de uma associação de Livten-L e Votag (Ativus Farmacêutica Ltda., São Paulo). Na fase de crescimento dos animais, a dieta

TAGC₇ 30% foi acrescida de 30% dos requerimentos nutricionais de ácidos graxos das séries ω -6 e ω -3 (12 g kg⁻¹ de dieta e 2 g kg⁻¹ de dieta, respectivamente) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) e a dieta TAGC₇ 50%, acrescida de 50% desses requerimentos. Na idade adulta, as dietas TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50% foram acrescidas de 7% e 34% dos requerimentos nutricionais de ω -6 e ω -3, respectivamente.

INGREDIENTES (g/Kg)	MISTURA VITAMÍNICA
Ácido nicotínico	3,000
Pantotenato de cálcio	1,600
Piridoxina-HCl	0,700
Tiamina-HCl	0,600
Riboflavina	0,600
Ácido fólico	0,200
Biotina	0,020
Vitamina B₁₂ (0,1% em manitol)	2,500
Vitamina E (500 IU/g)	15,000
Vitamina A (500.000 IU/g)	0,800
Vitamina D₃ (400.000 IU/g)	0,250
Vitamina K-1	0,075
Sacarose em pó	974,655

Quadro 3 – Mistura vitamínica utilizada nas dietas controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50% (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

2.5 Animais estudados

Foram utilizados trinta ratos machos da linhagem *Wistar*, recém-desmamados (22 a 26 dias de nascidos), pesando 47,22 g \pm 2,15 [m \pm s(m)], provenientes do biotério do Centro Universitário de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS/Centro de Estudos Superiores de Maceió – CESMAC/Fundação Educacional Jayme de Altavila – FEJAL.

Os animais foram divididos em três grupos (n = 10) identificados de acordo com a dieta oferecida, controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50%, e acondicionados em gaiolas metabólicas individuais no biotério de pesquisa do Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde/CSAU/UFAL, com temperatura ambiente (20 - 24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h) controladas, recebendo água e dieta *ad libitum*, por nove meses. Os ratos foram distribuídos nas gaiolas por ordem crescente de peso inicial, de modo a evitar diferenças significativas de peso entre os grupos. A evolução ponderal e a ingestão dietética dos animais foram controladas semanalmente.

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL tendo sido aprovado sob número 001316/2002-30.

Para efeito de avaliação das condições higiênico-sanitárias do biotério de pesquisa e sua repercussão sobre a saúde dos animais, foram realizados exames parasitológicos de fezes a cada dois meses de estudo no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia do Centro de Ciências Biológicas – CCBi/UFAL. Foi adotado o método HPJ de Hoffman, Pons e Janer (1934).

Foram utilizados, ainda, sete ratos machos da mesma linhagem e origem dos demais, aos dez meses de idade, para a obtenção de padrões de referência para as análises bioquímicas e histológicas, uma vez que foi observada esteatose hepática nos animais dos grupos controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50%. Aqueles animais constituíram o grupo controle dois.

2.5.1 Grupo controle

Foram utilizados dez ratos, pesando 46,60 g ± 3,84 [m ± s(m)], submetidos à dieta controle AIN-93 G do desmame ao final do segundo mês de vida e à dieta controle AIN-93 M, do terceiro ao décimo mês de vida, totalizando nove meses de estudo.

2.5.2 Grupos experimentais

Foram utilizados vinte ratos distribuídos em dois grupos ($n = 10$) submetidos às dietas experimentais TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50%, respectivamente, durante nove meses. Assim como no grupo controle, as dietas G foram utilizadas do desmame ao final do segundo mês de vida e as dietas M, do terceiro ao décimo mês de vida dos animais.

O peso inicial médio dos animais do grupo TAGC₇ 30% foi $47,72 \text{ g} \pm 3,94$ [$m \pm s(m)$] e do grupo TAGC₇ 50%, $47,34 \text{ g} \pm 3,80$ [$m \pm s(m)$].

2.5.3 Grupo controle dois

Com o intuito de obter padrões de referência para as análises bioquímicas e histológicas, foram utilizados sete ratos machos da linhagem *Wistar*, aos dez meses de idade, pesando $400,11 \text{ g} \pm 28,02$ [$m \pm s(m)$], provenientes do mesmo biotério dos demais. Esses animais foram desmamados aos trinta dias de idade, receberam água e ração comercial para roedores Labina® (lipídios totais 4,3%, proteína bruta 21%) *ad libitum* e foram mantidos no biotério de origem em gaiolas de polipropileno, em grupos de três animais cada, até a véspera do sacrifício.

2.6 Estudo do impacto do consumo das dietas controle e experimentais sobre a saúde dos animais

2.6.1 Avaliação do crescimento

Foram determinados os coeficientes de eficiência protéica (CEP) (AOAC, 1990; SGARBIERE, 1987; TAGLE, 1981) e de eficiência alimentar (CEA) (adaptado de TAGLE, 1981) para avaliar a influência da fonte de óleo sobre a qualidade das dietas e suas repercussões sobre o crescimento dos animais, através das equações:

$$CEP_{op} = \text{peso ganho (g)} / \text{proteína ingerida (g)} \times 100$$

onde:

CEP_{op} – CEP operacional, aqui calculado com dieta com 20% de proteína.

$$CEA = \text{peso ganho (g)} / \text{dieta ingerida (g)} \times 100$$

A quantidade de proteína das dietas (inclusive da ração comercial Labina®) foi determinada pelo método de Kjeldahl (AOAC – 954.01, 1990). Para efeito dos cálculos do CEP_{op} e do CEA, foram tomados os registros semanais de peso dos animais e da quota de dieta ingerida, nos primeiros 28 dias de experimento.

2.6.2 Coeficiente de digestibilidade lipídica

Foi determinado o coeficiente de digestibilidade lipídica aparente (D_{ap}) da mistura de óleos contida nas dietas controle e experimentais, através da equação (adaptada de TAGLE, 1981):

$$D_{ap} = \text{lipídio ingerido (g)} - \text{lipídio fecal (g)} / \text{lipídio ingerido (g)} \times 100$$

onde:

Dap – digestibilidade lipídica aparente, pois não foi considerado o lipídio fecal endógeno.

A extração e a determinação dos lipídios totais das dietas controle e experimentais, da ração comercial para roedores Labina® e das fezes dos animais foram realizadas através do método de Bligh e Dyer (1959). A amostra (3,0–3,5 g) foi triturada, colocada em erlenmeyer de 125 mL e homogeneizada com uma mistura de clorofórmio (10 mL), metanol (20 mL) e água destilada (8 mL), em agitador rotatório, durante 1 hora. Na seqüência, acrescentaram-se mais 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução de sulfato de sódio a 1,5%, agitando-se por mais

10 minutos. A mistura foi submetida à centrifugação a 3000 rpm, por 10 minutos. A camada metanólica contendo a água e os compostos não lipídicos foi descartada. A camada clorofórmica foi filtrada, colocada num balão de fundo redondo de 50 mL, seca em evaporador rotatório e pesada para a obtenção do extrato lipídico.

Foram realizadas coletas de fezes de sete dias consecutivos ao longo de todo o experimento. Para a análise dos lipídios fecais totais, foram tomados dois períodos distintos: da segunda à quarta semana de experimento (animais em crescimento) e da décima primeira à décima terceira semana de experimento (animais adultos). A digestibilidade lipídica aparente por animal em cada período considerado foi, portanto, obtida através da média de três determinações consecutivas de lipídios fecais totais.

2.6.3 Análises bioquímicas

Ao final do período de nove meses de exposição às dietas controle e experimentais, os animais foram mantidos em jejum noturno (12 horas), anestesiados por inalação de éter etílico e submetidos à coleta de sangue do plexo vascular retro-orbital, com auxílio de tubo capilar para micro-hematócrito. Os animais do grupo controle dois foram levados do biotério de origem ao biotério de pesquisa um dia antes do sacrifício, para serem igualmente submetidos ao jejum noturno.

Após a retração do coágulo, o sangue foi centrifugado a 3500 rpm, por 10 minutos. O soro obtido foi transportado a 10°C e processado no mesmo dia no Laboratório Central Dr. Aristeu Lopes (LACEN), em Maceió – Alagoas. As análises foram realizadas em aparelho TARGA 3000, Biotecnica Instruments S.p.A. (Wiener lab., Rosário, Argentina), através de *kits* (Synermed International Inc. Westfield, IN, USA). Foi adicionado 1 mL de soro de cada animal nas cubetas para análise robotizada e simultânea dos parâmetros bioquímicos considerados.

Foram determinadas as concentrações séricas de: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamil transferase (γ -GT), albumina, proteínas totais, uréia, creatinina,

ácido úrico, triacilgliceróis, colesterol total e frações: *high density lipoprotein cholesterol* (HDLc), *low density lipoprotein cholesterol* (LDLc) e *very low density lipoprotein cholesterol* (VLDLc), glicose e ferro para avaliação do efeito do óleo das dietas sobre as funções hepática e renal e o perfil lipídico sérico dos animais. As concentrações de VLDLc (triacilgliceróis ÷ 5) e de LDLc foram estimadas pela fórmula de Friedewald (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972):

$$LDLc = \text{colesterol total} - HDLc - \text{triacilgliceróis}/5$$

2.6.4 Sacrifício, dissecação e tratamento dos órgãos dos animais

Após a coleta de sangue descrita no item anterior, os animais, ainda anestesiados, foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, procedeu-se a abertura completa da cavidade abdominal e a retirada do fígado, do rim esquerdo e do intestino delgado. O fígado foi pesado e o lobo maior, lobo esquerdo, seccionado no seu maior diâmetro. O fragmento do fígado e os demais órgãos retirados foram imersos em solução de formol a 10%, para fixação. A porção remanescente do fígado foi pesada, congelada em nitrogênio líquido e mantida em *freezer* a -20°C para análises posteriores.

2.6.5 Análise histológica do fígado, rim e intestino delgado

Depois de fixados em formol a 10%, os órgãos foram clivados e os fragmentos levados ao Centro de Patologia de Maceió – CEPAMA, para o processamento, inclusão em parafina e coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE) de rotina. Foram adotados cortes longitudinais do rim e transversais do fígado, terço médio do duodeno e do jejuno e do terço proximal do íleo. Alterações macroscópicas dos órgãos, quando presentes, foram igualmente consideradas.

As análises histológicas ao microscópio ótico foram realizadas no setor de Patologia do Hospital Universitário da UFAL.

2.6.6 Determinação dos teores de lipídios totais do fígado

A extração e a determinação dos lipídios totais do fígado foram realizadas através do método de Bligh e Dyer (1959), descrito no item 2.6.2, em amostras de fígado congelado. A adição de água destilada foi reduzida de 8 mL para 2 mL em função da umidade da amostra, estimada em 50%. As análises foram realizadas em duplicata.

2.7 Análise estatística

Aplicou-se o teste F para a análise de variância e o teste de Tukey, para a comparação das médias dos tratamentos. Na ausência de homogeneidade das variâncias dos tratamentos aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis. Nesse caso, utilizou-se o método das comparações múltiplas para a localização das diferenças significativas entre os pares de tratamentos. Aplicou-se o teste para proporções para análise da gravidade dos casos de esteatose hepática e alterações da mucosa intestinal. Para a determinação do grau de relação entre duas variáveis aplicou-se o coeficiente de correlação e o teste t, como teste de hipótese para correlação. Em todos os casos adotou-se o nível crítico de 5% para o risco de falsa rejeição da hipótese nula ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Reação de esterificação entre o glicerol e o ácido enântico

Adotou-se uma técnica de esterificação direta do glicerol com o ácido enântico (heptanóico) para otimização das condições reacionais de síntese da trienantina, em meio reacional composto apenas pelos reagentes, baseada no trabalho de Grewal, Ramamurthi e McCurdy (1993). Nas condições aqui adotadas, foi possível minimizar a carbonização dos reagentes e o conseqüente escurecimento do meio reacional.

O rendimento da reação de esterificação do glicerol com o ácido enântico foi de 65%. O produto reacional foi constituído por 2% do monoacilglicerol, 34% do diacilglicerol e 64% do triacilglicerol. Em trabalho anterior (ATAÍDE, 1999), foram obtidos rendimentos de acilação de 80% e da trienantina, superiores a 99%, na ausência de solventes orgânicos e catalisadores químicos, porém em condições reacionais mais drásticas ($160 \pm 5^\circ\text{C}$ por 8 h mais $195 \pm 5^\circ\text{C}$ por 18 h).

O cuidado na manutenção de condições mais brandas se deveu à necessidade de diminuir ainda mais a formação de subprodutos, a exemplo da acroleína, de ação irritante sobre a mucosa gastrintestinal (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 1998). Dessa forma, aumentam-se as chances de aprovação dos produtos obtidos para o consumo humano tornando-se, portanto, atraentes para a indústria alimentícia.

A trienantina e a dienantina foram caracterizadas por técnicas espectroscópicas. O espectro da trienantina obtido na região do infravermelho em aparelho IVTF (apêndice 1) caracterizou-se por bandas de absorção a 2930 e 2859 cm^{-1} relacionadas aos estiramentos das ligações C-H e a 1744 cm^{-1} , associada aos grupos carbonílicos.

O espectro de RMN ^1H da trienantina (apêndice 2) apresentou um multiplete (m) a δ 5,27 ppm ($J = 5,7$ e $4,5$ Hz) referente ao H oximetínico em C_2 do glicerol. Os H em C_1 e C_3 forneceram dois sinais: duplo duplete (dd) a δ 4,31 ppm ($J = 12,0$ e $4,5$ Hz) e a δ 4,16 ppm ($J = 12,0$ e $5,7$ Hz), correspondentes a dois H cada. Na porção acila, observaram-se os sinais: tripleto (t) a δ 2,32 ppm ($J = 7,5$ Hz), referente aos H dos grupos CH_2 α aos grupos carbonílicos; quinteto (q) a δ 1,61 ppm ($J = 7,2$ Hz), referente aos H dos grupos CH_2 β aos grupos carbonílicos e banda larga (bl) a δ 1,28 – 1,36 ppm,

referente aos H dos demais grupos metilênicos. Os H dos grupos metílicos apareceram como tripleto (t) a δ 0,88 ppm ($J = 7,0$ Hz).

O espectro de RMN ^{13}C da trienantina (apêndice 3) apresentou sinais a: δ 173,34 ppm, correspondente aos grupos carbonílicos das cadeias laterais em C_1 e C_3 do glicerol e a δ 172,92 ppm, referente ao grupo carbonila da cadeia lateral em C_2 . Sinais a δ 34,07 ppm, referente aos grupos metilênicos α às carbonilas; a δ 31,44 ppm, referente aos grupos metilênicos β às carbonilas e a δ 28,78, 24,83 e 22,49 ppm, referentes aos demais grupos metilênicos. Os grupos metílicos apresentaram sinal a δ 14,03 ppm. A porção glicerila forneceu dois sinais: um a δ 62,12 ppm para C_1 e C_3 e outro a δ 68,89 ppm para C_2 .

O espectro de massas da trienantina (apêndice 1) foi caracterizado pela ausência do pico do íon molecular. O pico de maior relação massa/carga (m/z 299) correspondeu ao fragmento $[\text{M}-\text{RCO}_2]^+$ e o pico base (m/z 113), ao fragmento $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CO}^+$.

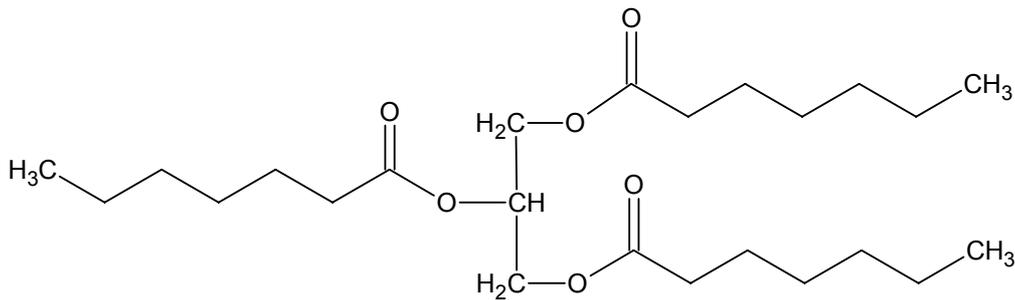
O espectro de IVTF da dienantina (apêndice 4) foi caracterizado por bandas de absorção a 3463 e 1741 cm^{-1} associadas aos grupos hidroxila e carbonila, respectivamente, e bandas a 2956, 2930 e 2859 cm^{-1} referentes aos estiramentos das ligações C-H.

O espectro de RMN ^1H da dienantina (apêndice 5) foi caracterizado por um multiplete (m) a δ 4,06 – 4,22 ppm associado aos cinco H em C_1 , C_2 e C_3 do glicerol. A porção acila caracterizou-se por um tripleto (t) a δ 2,35 ppm ($J = 7,5$ Hz), referente aos H dos grupos metilênicos α aos grupos carbonílicos; quinteto (q) a δ 1,62 ppm ($J = 7,5$ Hz), referente aos H dos grupos metilênicos β aos grupos carbonílicos e multiplete (m) a 1,25 – 1,35 ppm, correspondente aos H dos demais grupos metilênicos. Os H dos grupos metílicos forneceram sinal (t) a δ 0,89 ppm ($J = 7,5$ Hz).

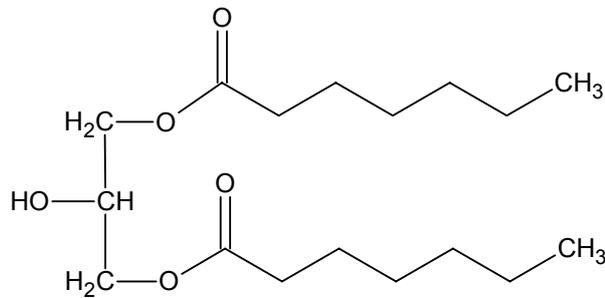
O espectro de RMN ^{13}C da dienantina (apêndice 6) apresentou sinal a δ 173,96 ppm, associado aos grupos carbonílicos das cadeias laterais em C_1 e C_3 do glicerol. Os demais sinais foram similares àqueles fornecidos pela trienantina. A acilação do glicerol tem início nas posições C_1 e C_3 , seguida por isomerização para a posição C_2 . Uma segunda acilação na posição C_1 (ou C_3), resulta no triéster (SELM I et al., 1997).

O espectro de massas da dienantina (apêndice 4) apresentou o pico base a m/z 113, correspondente ao fragmento $C_7H_{13}O^+$. O pico do íon molecular também não foi observado.

Com base nos dados de RMN 1H e ^{13}C apresentados, foi proposta a estrutura 1,3-dienantina para o diacilglicerol obtido.



Trienantina



1,3-dienantina

3.2 Avaliação do crescimento dos animais

Foram determinados os coeficientes de eficiência protéica (CEP) e alimentar (CEA), para avaliar a influência da fonte de óleo sobre a qualidade das dietas e suas repercussões sobre o crescimento dos animais. Por essa razão, adotou-se o número de dez animais por grupo de estudo. Este número está previsto em protocolos

internacionalmente aceitos para estudos de biodisponibilidade de nutrientes (AOAC – 960.48 e 974.31) (AOAC, 1990). Além disso, é o número mínimo de animais de experimentação, especificamente roedores, empregado em estudos toxicológicos de triacilgliceróis de cadeia média (TRAUL et al., 2000).

Não houve diferenças significativas entre os grupos controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50%, no tocante ao CEP e ao CEA (gráficos 1 e 2).

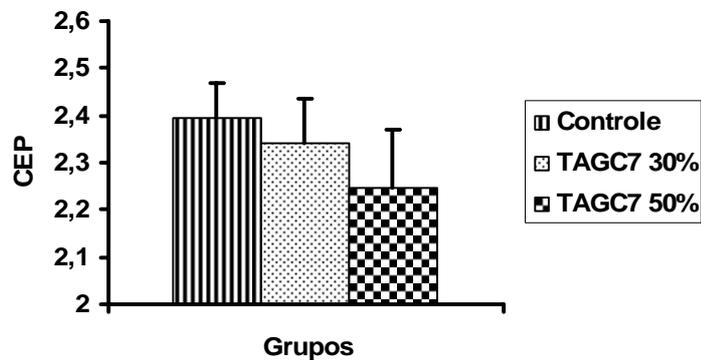


Gráfico 1 – Coeficiente de eficiência protéica (CEP) das dietas do grupo controle e dos grupos TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50% submetidos à substituição parcial do óleo da dieta pelo óleo experimental. [média ± s(m)]. (p>0,05).

O CEP é um método biológico para avaliar a qualidade nutricional da proteína da dieta, utilizado desde 1919, que consiste em relacionar a quantidade de peso ganho com a da proteína ingerida, em animais jovens. A principal vantagem do método reside na facilidade de execução e aplicação a qualquer organismo em crescimento (SGARBIERE, 1987), o que faz com que se mantenha atraente e em uso, como no trabalho de Raupp et al. (1999).

Uma vez que o crescimento é medido pela variação de peso dos animais, fatores como a concentração de proteína, a concentração e o tipo de gordura, a quantidade ingerida e, portanto, a palatabilidade das dietas estudadas, além da idade, linhagem e manuseio dos animais, podem interferir nos resultados obtidos.

Dentre os fatores citados, a concentração de proteína é o mais importante, reforçando o necessário cuidado com a padronização das dietas. Os valores de CEP freqüentemente diminuem à medida que a concentração de proteína aumenta muito

acima de 10% a depender, principalmente, da natureza da proteína considerada. Algumas proteínas investigadas podem não produzir crescimento algum dos animais de experimentação ou, ainda, provocar um decréscimo de peso (SGARBIERE, 1987).

A principal limitação do emprego de dietas com concentrações protéicas diferentes de 10% (recomendadas pelo método), como no estudo em questão, reside na dificuldade de comparação com estudos similares disponíveis na literatura. No entanto, a necessidade de determinação do CEP neste estudo foi gerada unicamente pelo fato de que a concentração e, mais precisamente, o tipo de lipídio dietético exercem influência sobre a utilização protéica (uma vez que as dietas controle e experimentais foram elaboradas com o mesmo tipo de proteína – caseína). Isso se deve ao fato de que transtornos de natureza digestiva, absorptiva ou metabólica dos lipídios dietéticos podem comprometer a incorporação das proteínas da dieta. Em outras palavras, o presente estudo buscou avaliar a eficiência energética das dietas na prevenção da utilização de suas proteínas para fins energéticos, com repercussões sobre o processo de crescimento dos animais, a partir da determinação do CEP.

Apesar da adoção do método em questão, sabe-se que a depender de sua composição, algumas dietas podem provocar retenção de água e/ou depósitos exagerados de lipídios e o ganho de peso não ser um reflexo fiel da proteína incorporada (SGARBIERE, 1987). No entanto, uma vez que as dietas controle e experimentais foram cuidadosamente elaboradas de modo a garantir uma mesma composição, exceto quanto ao tipo de óleo utilizado, foi possível estabelecer uma comparação do efeito da fonte lipídica sobre o ganho de peso e, de maneira indireta, sobre a assimilação protéica, nos animais estudados.

Vale ressaltar, ainda, que o consumo médio semanal de dieta num período de crescimento dos animais (da segunda à quarta semana de experimento) foi de $60,71\text{g} \pm 5,19$ [m \pm s(m)] no grupo controle, $58,30\text{g} \pm 5,17$ [m \pm s(m)] no grupo TAGC₇ 30% e $52,79\text{g} \pm 4,39$ [m \pm s(m)] no grupo TAGC₇ 50%, diferenças não significativas, o que descarta a influência da palatabilidade das dietas sobre a determinação do CEP, neste estudo.

Os resultados obtidos comprovaram que a substituição parcial do óleo de soja pelo óleo experimental, suplementado com ácidos graxos polinsaturados, não

comprometeu a utilização protéica para fins plásticos (síntese, manutenção e crescimento tecidual) nos grupos experimentais, quando comparados ao grupo controle. O óleo de soja, fonte exclusiva de lipídios da dieta controle, é uma das fontes lipídicas recomendadas em estudos com roedores (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993; REEVES, 1997).

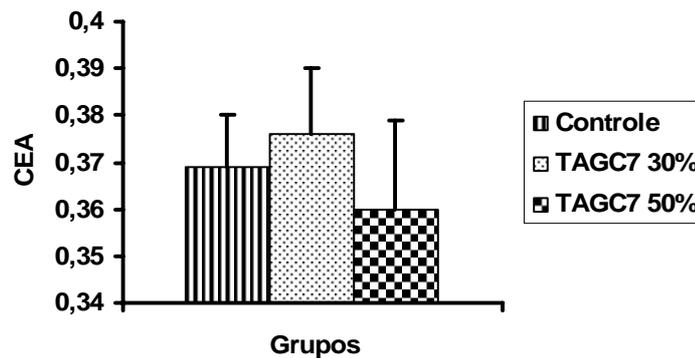


Gráfico 2 – Coeficiente de eficiência alimentar (CEA) das dietas do grupo controle e dos grupos TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50% submetidos à substituição parcial do óleo da dieta pelo óleo experimental. [média ± s(m)]. (p>0,05).

O coeficiente de eficiência alimentar (CEA), por sua vez, é um método de avaliação da qualidade da dieta que relaciona o peso ganho com a quantidade de dieta ingerida. Assim como o CEP, o CEA também não diferiu entre os grupos estudados.

No entanto, percentuais de substituição do óleo de soja pelo óleo experimental superiores aos empregados neste estudo e/ou uma maior contribuição lipídica na composição das dietas, poderiam promover repercussões sobre os coeficientes de eficiência protéica e de eficiência alimentar e, portanto, sobre a avaliação do crescimento dos animais. Isso pode ser explicado pelo maior efeito termogênico (taxa de oxidação maior e mais rápida) e, portanto, pela lipogênese reduzida dos triacilgliceróis de cadeia média (TCM), quando comparados aos triacilgliceróis de cadeia longa (TCL) (COLLEONE, 2002), presentes no óleo de soja.

O maior efeito termogênico dos TCM, quando comparados aos TCL, foi observado por Hashim e Tantibhedyangkul (1987), ao estudarem os efeitos dos TCM no crescimento do tecido adiposo de ratos jovens. Nesse estudo, os autores

constataram que ratos recém-desmamados alimentados com TCL tinham maior tamanho e número de adipócitos do que os que recebiam TCM. O mecanismo para a reduzida adiposidade em ratos alimentados com TCM pareceu estar relacionado com a sua extensiva oxidação e maior propensão para termogênese.

Baba, Braco e Hashim (1987) também concluíram que a elevada termogênese induzida por TCM é devida, provavelmente, à maior oxidação dos ácidos graxos de cadeia média em relação aos ácidos graxos de cadeia longa, aumentando o consumo de oxigênio e a dissipação de energia como calor e diminuindo a eficiência de ganho de peso e a deposição de gordura corporal. Hill et al. (1990) alertam, ainda, para o fato de que dietas hipercalóricas ricas em TCM apresentam maior efeito térmico pós-prandial que dietas similares ricas em TCL. Esse fato pode ser explicado pela síntese hepática *de novo* de ácidos graxos de cadeia longa, a partir do excesso de ácidos graxos de cadeia média.

Às considerações anteriores, deve-se somar o fato de que o óleo experimental era constituído por 2% do monoacilglicerol, 34% do diacilglicerol e 64% do triacilglicerol, o que contribuiu ainda mais para a redução da densidade energética das dietas experimentais, quando comparadas à dieta controle. Os óleos naturais são constituídos quase que exclusivamente de triacilgliceróis.

No entanto, para evitar deficiências de ácidos graxos essenciais, as dietas experimentais foram complementadas com ácidos graxos polinsaturados, através de uma associação de Livten-L e Votag (Ativus Farmacêutica Ltda., São Paulo). Tal complementação parece ter limitado o impacto da densidade energética das dietas experimentais, pois os pesos corporais finais dos animais dos grupos controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50% (508,82g ± 33,92; 481,16g ± 26,09 e 487,44g ± 31,04, respectivamente) [m ± s(m)], não diferiram significativamente.

Os requerimentos nutricionais de ácidos graxos essenciais para roedores (12g/kg de dieta para os ácidos graxos da série ω-6 e 2g/kg de dieta para os da série ω-3) são atendidos com 30g de óleo de soja por quilograma de dieta (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Uma vez que as dietas do tipo G eram compostas por 7% de óleo, as dietas experimentais do desmame ao final do segundo mês de vida supriram os requerimentos nutricionais mínimos dos animais (todas possuíam mais de 30g de óleo

de soja por quilograma de dieta). No entanto, para assegurar as exigências nutricionais da fase de crescimento, a dieta TAGC₇ 30% foi acrescida de 30% e, a dieta TAGC₇ 50%, acrescida de 50% dos requerimentos nutricionais de ω -6 e ω -3. Uma vez que as dietas do tipo M eram compostas por 4% de óleo, a dieta TAGC₇ 30% foi acrescida de 7% e a dieta TAGC₇ 50% acrescida de 34% dos requerimentos nutricionais de ω -6 e ω -3, a partir do terceiro mês de vida até o final do experimento (idade adulta).

A partir da análise dos resultados obtidos, pode-se concluir que os animais submetidos às dietas controle e experimentais apresentaram semelhante padrão de crescimento. Portanto, não houve influência da composição em óleo das dietas estudadas sobre o crescimento dos animais.

3.3 Coeficiente de digestibilidade lipídica aparente

A digestibilidade é um fator condicionante da qualidade nutricional de um dado nutriente, pois influencia a sua absorção e excreção. Ela é determinada pela medida do nutriente ingerido através da dieta e de sua eliminação nas fezes, no mesmo período de tempo.

A digestibilidade verdadeira é determinada considerando-se o nutriente em estudo previamente incorporado ao animal (endógeno) que é excretado nas fezes junto com aquele oriundo da dieta, através da descamação do epitélio e das secreções gastrintestinais. A excreção fecal do nutriente endógeno é estimada através da análise das fezes de um grupo semelhante de animais mantidos em dieta isenta do nutriente considerado, pelo mesmo período que durar o experimento (SGARBIERE, 1987).

No entanto, para efeito de comparação entre diferentes tipos de dietas num mesmo estudo é comum a determinação da digestibilidade aparente, pois dispensa a necessidade de grupo adicional de animais e reduz os custos e o tempo de experimentação. A digestibilidade aparente é dada pela relação entre o nutriente absorvido (ingerido – fecal) e o nutriente ingerido (SGARBIERE, 1987). Portanto, nesse caso, consideram-se apenas a quantidade ingerida e a excreção fecal total do nutriente em estudo.

A maioria dos lipídios, diferente do que muitos acreditam, é altamente digerível; geralmente mais de 95% dos lipídios ingeridos são absorvidos e utilizados pelo organismo (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 1998).

Os resultados de digestibilidade lipídica aparente no período de crescimento dos animais (gráfico 3) apresentaram-se dentro dos padrões esperados; a média dos grupos oscilou perto de 95% (diferenças não significativas).

Apesar dos TCM serem mais solúveis e, portanto, mais prontamente absorvíveis que os TCL, não foram observadas vantagens sobre a digestibilidade lipídica nos grupos submetidos à substituição parcial do óleo de soja pelo óleo experimental.

Contudo, na fase de crescimento os animais apresentam necessidades nutricionais especiais, como um maior aporte calórico por unidade de peso, quando comparados aos animais adultos. Nessa situação, pressupõe-se uma melhor assimilação dos nutrientes presentes nas dietas fazendo com que pequenas variações na qualidade das mesmas possam passar despercebidas. Talvez por isso, os níveis de substituição do óleo de soja pelo óleo experimental empregados neste estudo, não tenham sido suficientes para determinar diferenças significativas de digestibilidade lipídica aparente entre os grupos.

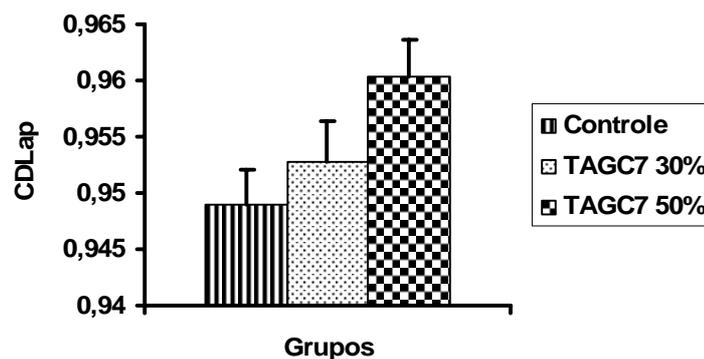


Gráfico 3 – Coeficiente de digestibilidade lipídica aparente (CDLap) das dietas do grupo controle e dos grupos TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50% submetidos à substituição parcial do óleo da dieta pelo óleo experimental, na fase de crescimento dos animais. [média ± s(m)]. (p>0,05).

Entretanto, na fase adulta dos animais, a dieta com maior nível de substituição do óleo de soja pelo óleo experimental, TAGC₇ 50%, foi aquela que apresentou maior digestibilidade lipídica aparente (gráfico 4).

Nesse caso, a maior solubilidade dos TCM em relação aos TCL parece ter sido decisiva, uma vez que os animais já não apresentavam necessidades nutricionais especiais próprias do processo de crescimento. Os resultados levam a crer, ainda, que em situações de prejuízo dos processos de digestão e absorção dos lipídios dietéticos, como na insuficiência pancreática, insuficiência hepática, obstrução biliar e doença celíaca, dentre outras, ou na necessidade de suprimento energético imediato, como nos estados hipercatabólicos, infecções acentuadas, pré- e pós-operatório, etc., as dietas TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50% poderiam induzir um maior coeficiente de digestibilidade lipídica aparente.

Além disso, um nível maior de substituição do óleo de soja pelo óleo experimental (acima de 50%), possivelmente contribuiria com o aumento da eficiência absorptiva dos lipídios dietéticos, até mesmo em animais adultos normais. Todavia, vale ressaltar que tal aumento não teria significado fisiológico importante, uma vez que todos os grupos apresentaram digestibilidade lipídica aparente média superior a 90%.

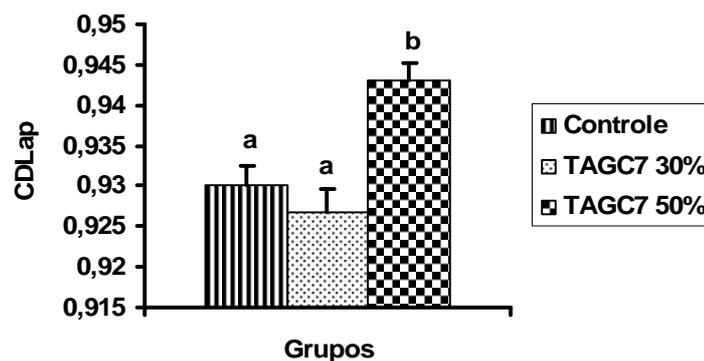


Gráfico 4 – Coeficiente de digestibilidade lipídica aparente (CDLap) das dietas do grupo controle e dos grupos TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50% submetidos à substituição parcial do óleo da dieta pelo óleo experimental, na idade adulta dos animais. [média ± s(m)]. **a** ≠ **b** (p<0,01).

3.4 Análises bioquímicas

3.4.1 Marcadores de lesão e provas de função hepática

Dentre as provas bioquímicas diretas de dano hepatocelular, aquelas que medem a presença de compostos intracelulares no espaço extracelular, incluem-se as determinações das aminotransferases (antes denominadas transaminases): aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), indicadoras de integridade celular e, fosfatase alcalina (FA) e gama-glutamil transferase (γ -GT), indicadoras de reação celular ou sobrecarga, valiosas no diagnóstico de doença hepatobiliar (COLICHON; TOREZAN FILHO; STRAUSS, 2001).

As aminotransferases catalisam as reações de transferência de grupamentos α -amino de L-aminoácidos ao átomo de carbono alfa do α -cetogluturato. O grupo prostético de todas elas é o fosfato de piridoxal, derivado da piridoxina (vitamina B₆) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000). A AST catalisa a transferência da amina do aspartato para o α -cetogluturato e a ALT, da alanina para o α -cetogluturato. Dessas transferências obtêm-se o oxaloacetato e o piruvato, respectivamente, e o glutamato, como produto comum às duas reações. Os dois primeiros são importantes intermediários metabólicos que podem ser convertidos em glicose ou oxidados pelo ciclo do ácido cítrico. O glutamato sofre desaminação oxidativa gerando α -cetogluturato e íon amônio, cujo excesso é excretado na urina sob a forma de uréia (STRYER, 1992). As reações catalisadas pelas aminotransferases são, portanto, necessárias à utilização do excesso de aminoácidos para fins energéticos.

As aminotransferases são enzimas intracelulares presentes na maioria dos tecidos, principalmente no fígado, coração e músculo esquelético. São encontradas também no tecido adiposo, cérebro, rim, pâncreas, baço e pulmão, porém em quantidades menores (COLICHON; TOREZAN FILHO; STRAUSS, 2001).

No hepatócito, a AST encontra-se no citoplasma e nas mitocôndrias e a ALT, apenas no citoplasma, em concentrações elevadas. Em função da sua localização, a ALT é uma enzima facilmente liberada em situação de alteração do hepatócito, sendo a mais utilizada no diagnóstico de processo inflamatório ou necrótico do fígado. A

elevação da AST, por sua vez, deve-se primariamente ao conteúdo citoplasmático, nas lesões hepáticas leves. Contudo, quando a lesão se agrava, a AST mitocondrial também é liberada. Portanto, altos níveis séricos de AST indicam alteração total do hepatócito. Sua determinação é útil no diagnóstico de doenças hepáticas crônicas em atividade (COLICHON; TOREZAN FILHO; STRAUSS, 2001).

A ALT, por sua vez, eleva-se principalmente na presença de hepatopatias, embora lesões significativas nos rins, coração e musculatura esquelética possam afetar seus níveis séricos. Ela tem sido utilizada para auxiliar na confirmação da origem hepática do aumento da AST, apesar das limitações de sua especificidade, como também no diagnóstico diferencial da hepatopatia, através da relação AST/ALT (RAVEL, 1997).

Os valores séricos de referência para humanos adultos são de 4 a 15 UI/L para a AST e de 5 a 20 UI/L, para a ALT (COLICHON; TOREZAN FILHO; STRAUSS, 2001), com variações entre laboratórios a depender do método empregado. Na lesão hepática leve, os níveis séricos podem sofrer elevações de caráter transitório e de baixa intensidade ou, até mesmo, permanecer inalterados.

Muitas são as doenças comuns que apresentam elevação leve ou moderada dos níveis de AST (até 10 x os valores de referência), como a hepatite aguda na fase de recuperação, a hepatite crônica, a cirrose ativa ou hepatopatia alcoólica, as disfunções hepáticas induzidas por drogas, o tumor hepático metastático, a obstrução extra-hepática prolongada do ducto biliar, a mononucleose infecciosa, o fígado gorduroso, o infarto agudo do miocárdio e a pancreatite aguda, dentre outras. Pacientes obesos podem apresentar limites superiores de referência até 50% mais elevados que os de indivíduos normais. Na hepatite viral aguda, no entanto, os níveis séricos de AST encontram-se freqüentemente elevados para mais de dez vezes os valores de referência, podendo ultrapassar vinte vezes esses valores (RAVEL, 1997).

O grau e a freqüência de elevação dos níveis séricos de ALT são quase os mesmos da AST nos quadros de hepatite viral, mononucleose infecciosa e lesão da célula hepática induzida por drogas. Contudo, uma relação AST/ALT < 1,0 constitui-se um achado típico na hepatite aguda viral e na mononucleose infecciosa. Nos quadros de hepatopatia alcoólica aguda ou cirrose ativa (relação AST/ALT de 1,5 ou 2,0),

obstrução extra-hepática prolongada dos ductos biliares e tumor metastático para o fígado, o grau e a frequência de elevação da ALT são geralmente menores (relação AST/ALT > 1,0) (RAVEL, 1997). Nas hepatites virais, os níveis séricos de ALT podem ultrapassar 1000 UI/L, principalmente na hepatite A. A ALT é, ainda, muito sensível para o diagnóstico de transtornos hepáticos iniciais, a exemplo da esteatose e esteato-hepatite não alcoólica (COLICHON; TOREZAN FILHO; STRAUSS, 2001).

Apesar do grande número de trabalhos disponíveis na literatura com animais de laboratório, ainda se constitui um problema a adoção de um padrão de referência para as análises bioquímicas dos mesmos. Frequentemente os dados são incompletos e/ou apresentam grande variação entre as diversas fontes. Diferenças entre técnicas e horários de coleta, manuseio e armazenamento do sangue, tempo de jejum e métodos de análise adotados dificultam a comparação dos resultados obtidos em diferentes estudos. Além disso, ratos e camundongos podem apresentar variações nos parâmetros bioquímicos determinadas por diferenças de sexo, linhagem e genótipo, que são influenciadas pela idade, dieta, manuseio e condições ambientais, dentre outros fatores (PINHEIRO et al., 2003). Por essas razões não há um valor universal para qualquer parâmetro bioquímico considerado.

Para minimizar o problema de adoção de padrão de referência para as análises bioquímicas e histológicas neste estudo, foram tomados sete animais adultos do mesmo sexo, linhagem e procedência dos demais. Esses animais, que constituíram o grupo controle dois, foram trazidos do biotério de origem para as dependências do biotério de pesquisa às vésperas do sacrifício, para serem submetidos ao jejum noturno. A partir daí, receberam o mesmo tratamento que aqueles dos demais grupos.

Não houve diferenças significativas dos níveis de AST e ALT entre os grupos controle, TAGC₇ 30%, TAGC₇ 50% e controle dois (tabela 1).

De uma maneira geral, assume-se que os níveis de ALT no soro de ratos normais situam-se no limite superior do intervalo de normalidade para humanos (estabelecido no método particular empregado) e que os níveis de AST normalmente estão acima desse intervalo (RINGLER; DABICH, 1979). Os valores de referência para humanos no método de análise adotado (Synermed®) são: 3,0 a 41,0 U/L para ALT e 7,0 – 46,0 U/L para AST.

ANÁLISES BIOQUÍMICAS					
	GRUPOS				PADRÕES DE REFERÊNCIA
	Controle m ± s(m)	TAGC ₇ 30% m ± s(m)	TAGC ₇ 50% m ± s(m)	Controle 2 m ± s(m)	
AST (U/L)	237,8 ± 24,74	224,65 ± 15,33	189,70 ± 14,88	169,28 ± 16,79	46 ¹
ALT (U/L)	150,14 ± 24,86	143,06 ± 16,07	122,45 ± 16,06	103,14 ± 7,75	41 ¹
Fosfatase alcalina (U/L)	310,14 ± 102,72	350,84 ± 89,85	263,65 ± 92,47	112,11 ± 19,30	56,8 - 128 ²
γ-GT (U/L)	43,50 ± 7,56	51,32 ± 6,58	48,77 ± 5,62	38,87 ± 5,23	12 - 64 ¹
Albumina (g/dL)	4,23 ± 0,17	4,14 ± 0,08	4,08 ± 0,04	3,83 ± 0,51	3 - 5 ^{2,3}
Proteínas totais (g/dL)	6,88 ± 0,09 ^a	6,97 ± 0,11 ^a	6,94 ± 0,14 ^a	9,87 ± 0,96 ^b	4,70 - 8,15 ²
Uréia (mg/dL)	29,02 ± 1,50 ^a	32,53 ± 1,29 ^c	31,31 ± 1,26 ^a	50,98 ± 4,09 ^b	5 - 29 ²
Creatinina (mg/dL)	0,78 ± 0,18	0,86 ± 0,10	0,65 ± 0,12	0,78 ± 0,03	0,2 - 0,8 ²
Ácido úrico (mg/dL)	1,19 ± 0,10 ^{a,b}	1,18 ± 0,09 ^{a,b}	0,99 ± 0,07 ^a	2,97 ± 0,25 ^b	1,2 - 7,5 ²
Triacilgliceróis (mg/dL)	97,45 ± 6,83	90,91 ± 10,60	104,94 ± 7,83	116,37 ± 9,50	
Colesterol total (mg/dL)	124,95 ± 8,36 ^a	123,68 ± 12,21 ^a	128,91 ± 9,12 ^a	197,73 ± 13,58 ^b	
HDLc (mg/dL)	21,05 ± 1,74	23,52 ± 3,58	22,58 ± 2,58	31,39 ± 3,24	
VLDLc (mg/dL)	19,48 ± 1,37	18,18 ± 2,12	20,99 ± 1,56	23,27 ± 1,90	
LDLc (mg/dL)	84,41 ± 7,16 ^a	79,74 ± 7,37 ^a	85,34 ± 6,87 ^a	162,27 ± 10,60 ^b	
Glicose (mg/dL)	110,50 ± 4,71 ^{a,b}	115,04 ± 4,67 ^{a,b}	121,43 ± 3,83 ^b	94,33 ± 8,70 ^a	50 - 135 ²
Ferro (mg/dL)	122,70 ± 17,64	96,10 ± 13,78	107,85 ± 14,03	90,14 ± 4,71	

Tabela 1 – Análises bioquímicas do soro dos animais dos grupos controle, TAGC₇ 30%, TAGC₇ 50% e controle dois.
(b ≠ a, p<0,01; b ≠ c, p<0,05; a não difere de c; valores na linha seguidos por pelo menos uma mesma letra: diferenças não significativas).
¹ Synermed®; ² Mitruka e Rawnsley, 1977; ³ Ringler e Dabich, 1979.

Assim sendo, constatou-se que os níveis de ALT e AST no soro dos animais apresentaram-se elevados. Foram observados aumentos de 2,5 a 3,5 vezes os valores esperados para ALT e de 4 a 5 vezes para AST e uma relação AST/ALT de 1,6 em todos os grupos estudados.

O aumento dessas enzimas é um dos marcadores mais sensíveis de doenças hepáticas induzidas por drogas, que abrangem um espectro que vai desde alterações bioquímicas e estruturais adaptativas, até a lesão hepática propriamente dita. Dentre elas, a hepatite aguda é a mais freqüente; cerca de 10% dos casos têm origem medicamentosa (GAYOTTO; VIANNA; LEITÃO, 2001).

Embora os dados bioquímicos sejam sugestivos de injúria hepática, os animais do grupo controle dois não apresentaram qualquer alteração morfológica que justificasse os aumentos encontrados (figura 4 A, p. 87). Nos demais grupos, entretanto, foram observados quadros de esteatose hepática macrovesicular, em diferentes graus, cujos padrões estão apresentados na figura 4 (B - G).

As composições das dietas dos grupos controle e controle dois descartam qualquer possibilidade de indução do aumento das aminotransferases pelo óleo experimental (efeito tóxico), nesses grupos. O fato do padrão da elevação ter sido semelhante em todos os grupos estudados leva a crer que, mesmo nos grupos TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50%, a elevação das aminotransferases não se deveu ao consumo do óleo em estudo. Se assim o fosse, poderia se esperar um grau maior de elevação nesses animais.

Apesar de preocupantes, níveis elevados de aminotransferases foram encontrados anteriormente em ratos *Wistar* aparentemente normais. Em laudo clínico publicado pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP, 2003), observam-se níveis alterados de aminotransferases em ratos *Wistar* adultos mantidos no Centro de Bioterismo daquela instituição, com aumentos de 2 – 3 vezes os valores utilizados como referência. Não havia qualquer menção a exames histológicos para a detecção de alterações que justificassem os achados. No entanto, segundo informações publicadas, as causas da elevação estavam sob investigação.

No intuito de estabelecer uma possível causa para os aumentos de AST e ALT aqui observados, promoveu-se um estudo de correlação entre os níveis dessas

enzimas e os graus de esteatose hepática, relação peso do fígado/peso corporal e peso corporal final do conjunto de todos os animais estudados (gráfico 5).

Em todos os casos foram observadas correlações positivas fracas ($r < 0,5$). A exceção da correlação entre ALT e relação peso do fígado/peso corporal, todas as demais foram significativas (algumas altamente significativas). Apesar de fracas, as correlações demonstraram a influência do quadro de esteatose hepática e do peso corporal dos animais sobre a elevação das aminotransferases, neste estudo.

No fígado gorduroso, causa comum de hepatomegalia de etiologia desconhecida no homem, as provas de função hepática são variáveis podendo até mesmo não apresentar nenhuma anormalidade, principalmente nos casos não complicados. Os níveis de ALT podem se apresentar levemente aumentados (até 2 vezes) e, os de AST, até 5 vezes, especialmente nos graus mais intensos de metamorfose gordurosa (RAVEL, 1997). Esses achados justificam os resultados obtidos nos testes de correlação entre as aminotransferases e os graus de esteatose hepática, aqui observados (gráfico 5 A e B).

Vale ressaltar que os ratos são modelos animais amplamente utilizados no estudo da doença do fígado gorduroso não alcoólica e na avaliação do efeito tóxico de vários compostos sobre o fígado (RINGLER; DABICH, 1979; KOTEISH; DIEHL, 2002).

A correlação entre AST e relação peso do fígado/peso corporal (gráfico 5 C) contribuiu com a análise da influência da esteatose hepática sobre a elevação da AST. Isso pode ser explicado pela boa correlação observada entre relação peso do fígado/peso corporal e graus de esteatose hepática ($r = 0,7$), altamente significativa ($p < 0,0001$) (gráfico 6 A), como era de se esperar. Com a ALT, por sua vez, isso não foi observado (gráfico 5 D).

A preocupação com a determinação das correlações entre as aminotransferases e o peso corporal dos animais se deveu ao fato, já mencionado, de que indivíduos obesos podem apresentar elevação de até 50% dos níveis de AST observados em indivíduos eutróficos (RAVEL, 1997). Além disso, a obesidade é fator predisponente ao quadro de esteatose hepática, especialmente quando associada ao *diabetes* tipo 2 (MARCHESINI et al., 2001).

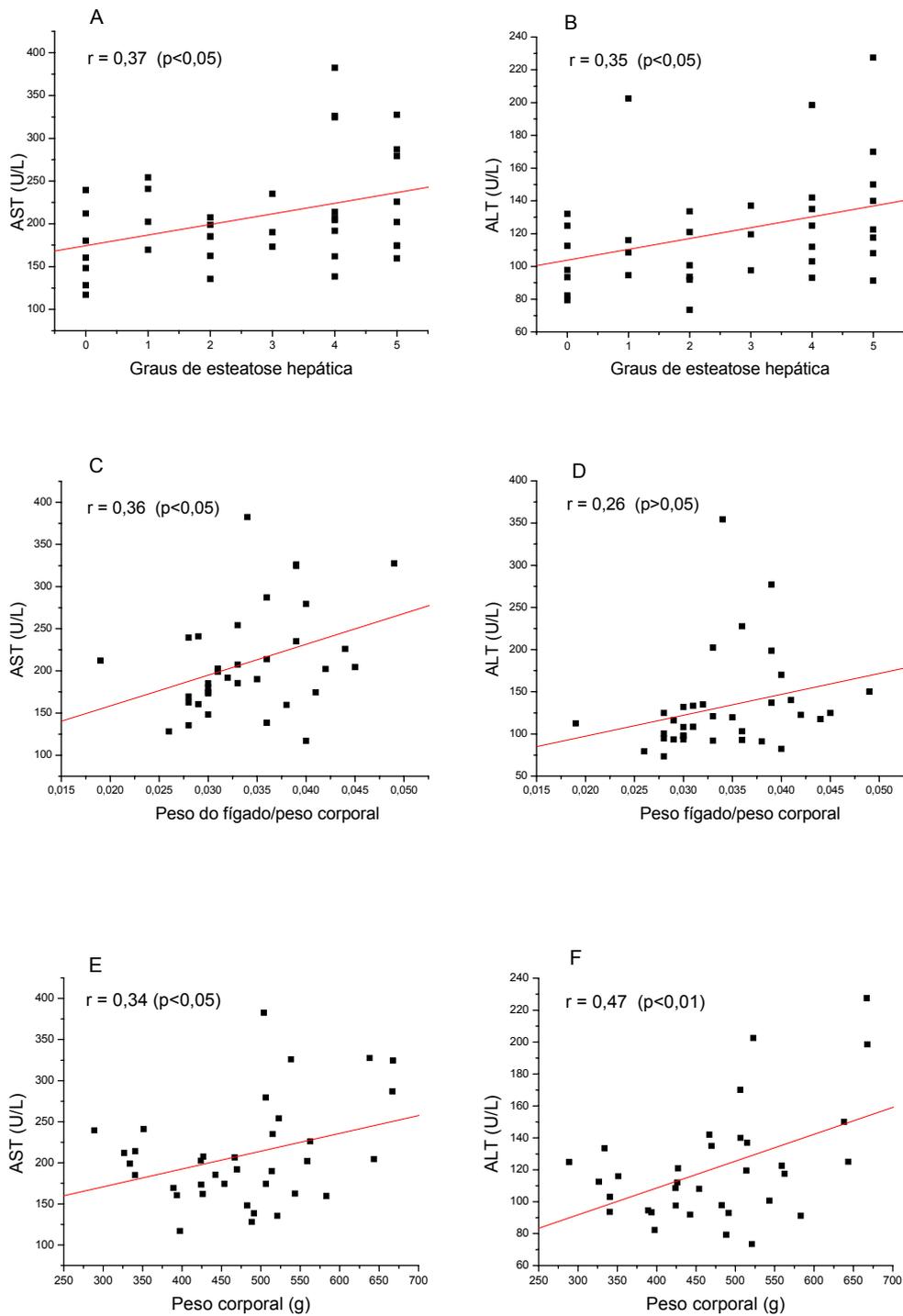


Gráfico 5 – Correlações entre AST e graus de esteatose hepática, relação peso do fígado/peso corporal e peso corporal (**A**, **C** e **E**, respectivamente) e entre ALT e graus de esteatose hepática, relação peso do fígado/peso corporal e peso corporal (**B**, **D** e **F**, respectivamente), no conjunto dos animais dos grupos controle, TAGC₇ 30%, TAGC₇ 50% e controle dois.

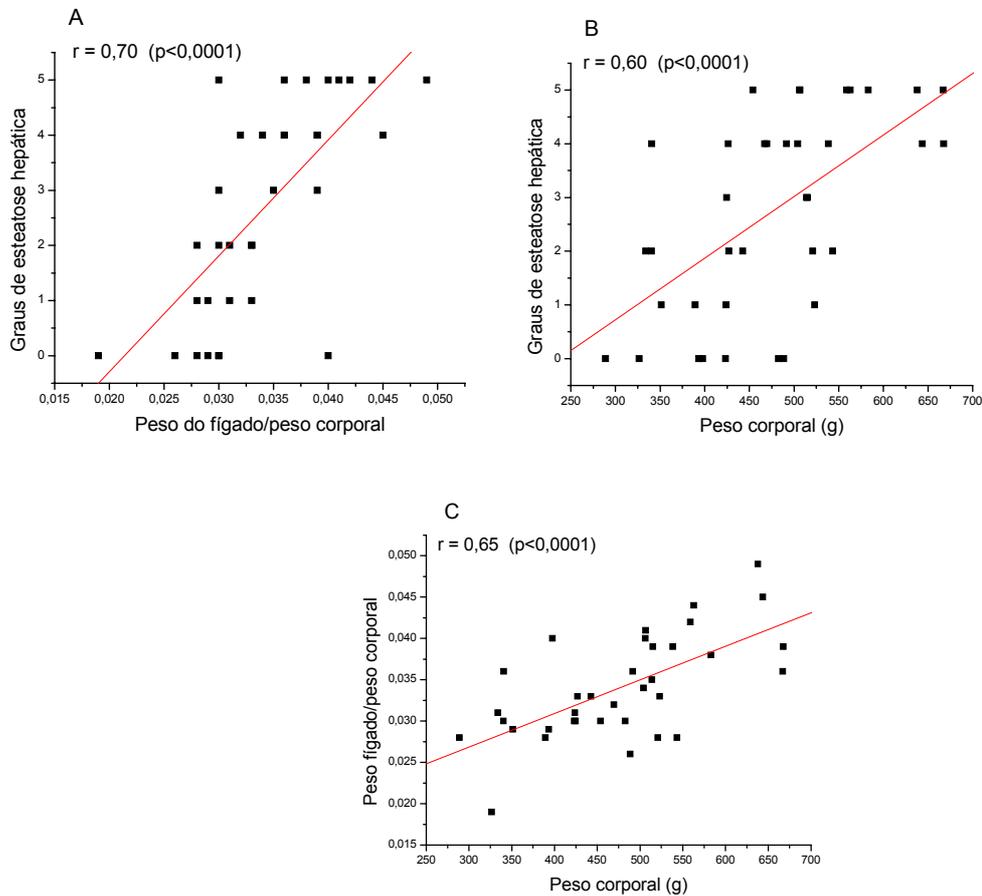


Gráfico 6 - Correlações entre relação peso do fígado/peso corporal e graus de esteatose hepática (A), peso corporal e graus de esteatose hepática (B) e peso corporal e relação peso do fígado/peso corporal (C), no conjunto dos animais dos grupos controle, TAGC₇ 30%, TAGC₇ 50% e controle dois.

Apesar de as diferenças de peso corporal entre os diversos grupos estudados não terem sido significativas (gráfico 7), foram observadas correlações positivas fracas significativas entre as aminotransferases e o peso corporal dos animais (gráfico 5 E e F). Uma vez que as correlações entre peso corporal e graus de esteatose hepática, e peso corporal e relação peso do fígado/peso corporal foram positivas e altamente significativas (gráfico 6 B e C, respectivamente), não restam dúvidas de que o peso corporal dos animais e o quadro de esteatose hepática também estão intimamente relacionados neste estudo. No entanto, vale ressaltar que os animais eram normais

(não geneticamente obesos) e, por isso, resistentes ao ganho excessivo de peso (AKIYAMA et al., 1996), especialmente com consumo *ad libitum* de dietas cujas composições não foram modificadas para esse fim.

Uma discussão mais detalhada sobre o quadro de esteatose hepática e demais achados histopatológicos está apresentada nos itens 3.5, 3.6 e 3.7.

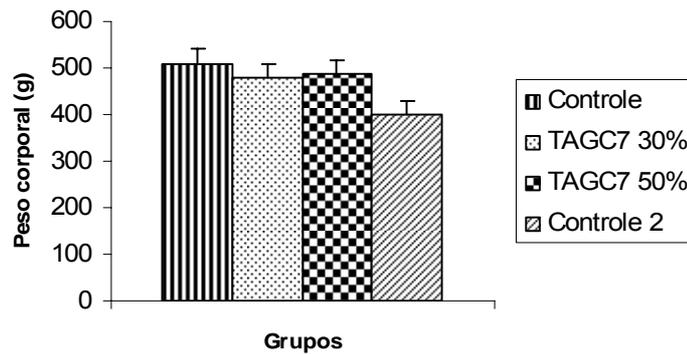


Gráfico 7 – Peso corporal dos animais dos grupos controle, TAGC7 30%, TAGC7 50% e controle dois, aos dez meses de idade. [média ± s(m)]. ($p > 0,05$).

A exemplo das aminotransferases, a fosfatase alcalina (FA) e a gama-glutamil transferase (γ -GT) não diferiram significativamente entre os quatro grupos estudados (tabela 1, p. 55). No entanto, foram observadas variações muito altas (coeficientes de variação > 30) em todos os grupos, o que pode ter sido decisivo para os resultados dos testes estatísticos. Vale ressaltar, contudo, que os padrões de referência para humanos de FA e de γ -GT para o método empregado (Synermed®), variam de 37 a 147 U/L e de 12 a 64 U/L, respectivamente. Pressupondo tamanha variação, haveria necessidade de um número infinitamente maior de animais por grupo de estudo para minimizar o problema da dispersão dos dados. Num cálculo de dimensionamento de amostras, ajustando a margem de erro em torno da média de cada grupo para 10%, foram calculados tamanhos de amostras até 50 vezes maiores que os utilizados neste estudo.

Face ao exposto e considerando a natureza das análises em questão, é interessante observar que apenas o grupo controle dois apresentou valores de FA próximos do padrão de referência para ratos *Wistar* adultos machos adotado pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (2003), que varia entre 56,8 e

128 U/L (MITRUKA; RAWNSLEY, 1977). As determinações de FA variaram entre 95,6 e 847 U/L no grupo controle, 97,4 e 828 U/L no grupo TAGC₇ 30%, 87 e 866 U/L no grupo TAGC₇ 50% e entre 71,15 e 214,5 U/L no grupo controle dois. Os ratos do Centro de Bioterismo da FMUSP apresentaram níveis médios de FA de 126 ± 82 U/L (m \pm DP), semelhantes aos observados no grupo controle dois ($112,11 \pm 51,08$ U/L, m \pm DP). Os demais grupos apresentaram médias de FA muito acima desses valores.

A partir dessas considerações, parece razoável concluir pela elevação dos níveis de FA em todos os grupos estudados, especialmente nos grupos controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50%.

As fosfatases catalisam reações de hidrólise de grupamentos fosforila de determinados fosfatos orgânicos (MAYES, 1998). Essas reações incluem a reversão da atividade enzimática promovida por fosforilação das proteínas quinases. Por essa razão, estão envolvidas em grande número de mecanismos reguladores vitais, como no controle da glicemia e na liberação de lipídios do tecido adiposo (STRYER, 1992).

As fosfatases não específicas que hidrolisam os ésteres do ácido monofosfórico em um pH alcalino são denominadas fosfatases alcalinas. Suas isoenzimas estão amplamente distribuídas em todos os tecidos corporais, especialmente na mucosa intestinal, nos túbulos renais, nos ossos, nos leucócitos, no fígado, no epitélio do trato biliar e na placenta (RAVEL, 1997; MILLER; GONÇALVES, 1999). Os tecidos hepático e ósseo são os maiores responsáveis pela elevação da FA sérica, o que diminui a sua especificidade como marcadora de lesão hepática (CÂMARA FILHO; DE SOUZA, 2000).

Seus valores são mais elevados em crianças e adolescentes, bem como em ratos jovens em fase de crescimento, devido ao crescimento ósseo ativo (RINGLER; DABICH, 1979). Na gestação também são observados níveis mais altos de FA. Elevações leves ou moderadas são observadas nos distúrbios do parênquima hepático, como na hepatite e cirrose; elevações mais intensas e persistentes estão presentes nas colestatas (MILLER; GONÇALVES, 1999).

Embora a FA hepática possa estar elevada em qualquer hepatopatia ativa, os níveis séricos são particularmente sensíveis à obstrução do trato biliar de origem intra-hepática, devida à lesão aguda dos hepatócitos, obstrução do trato biliar de origem

extra-hepática (ducto biliar comum) e lesões hepáticas invasivas (tumor, abscesso, granuloma), nos mais variados graus de afecção. Devem-se considerar também as disfunções hepáticas induzidas por drogas. O grau de elevação freqüentemente reflete a gravidade da obstrução e a quantidade de tecido biliar afetado. Na cirrose inativa e no fígado gorduroso não complicado de grau leve, os níveis de FA freqüentemente não estão alterados (RAVEL, 1997).

Uma vez que a esteatose hepática foi o único achado histológico relevante encontrado no fígado de todos os animais, exceto nos do grupo controle dois, buscou-se estudar a correlação entre os níveis de FA e os graus de esteatose hepática, relação peso do fígado/peso corporal e peso corporal final do conjunto dos animais estudados, a exemplo do que foi feito com as aminotransferases. Foram observadas correlações positivas fracas nos dois primeiros casos (gráfico 8 A e B, respectivamente). No entanto, não foi observada correlação entre FA e peso corporal ($r=0,19$; $p>0,05$).

Face ao exposto, pode-se concluir pela influência do quadro de esteatose hepática sobre os níveis de FA, neste estudo.

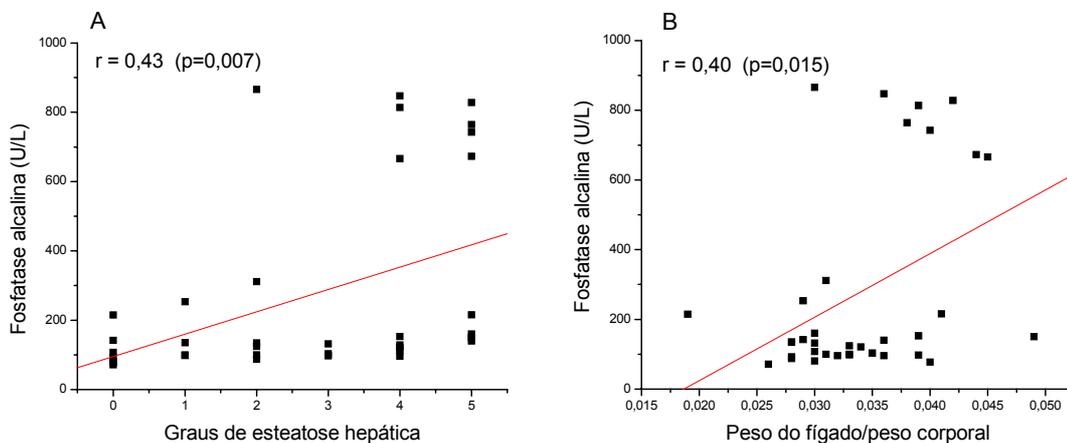


Gráfico 8 – Correlações entre fosfatase alcalina e graus de esteatose hepática (A) e fosfatase alcalina e relação peso do fígado/peso corporal (B) no conjunto dos animais dos grupos controle, TAGC₇ 30%, TAGC₇ 50% e controle dois.

A importância do uso de γ -GT reside na confirmação da origem hepática da elevação dos níveis de FA, uma vez que fornece informações semelhantes a ela na

hepatopatia, mas é mais específica. De um modo geral, os níveis de γ -GT não estão alterados na doença óssea, durante o crescimento ou na gestação. Isso explica a sua utilidade no diagnóstico diferencial da origem hepática ou extra-hepática dos níveis elevados de FA (RAVEL, 1997).

A γ -GT, uma enzima ligada à membrana, está envolvida num mecanismo alternativo de transporte de aminoácidos através da membrana plasmática de alguns tecidos. Catalisa a transferência do grupo γ -glutamil do glutation (γ -glutamilcisteinilglicina) para o aminoácido que está sendo transportado, levando à formação de um dipeptídeo. Essa modificação química da molécula transportada reduz sua afinidade com o transportador, facilitando a sua liberação dentro da célula. Esse processo é chamado transporte de grupo. É um mecanismo de transporte ativo que necessita de mais energia que outros, mas é mais rápido e tem alta capacidade. Todos os aminoácidos, exceto a prolina, podem ser transportados através desse mecanismo (DEVLIN, 1998).

A γ -GT está presente predominantemente no fígado e nos rins e, em menores concentrações, no epitélio do trato biliar, intestino, coração, cérebro, pâncreas e baço (RAVEL, 1997). Seu significado clínico refere-se especialmente às doenças do fígado e das vias biliares, onde exibe grande sensibilidade (MILLER; GONÇALVES, 1999).

A causa mais comum de elevação da γ -GT sérica é a hepatopatia ativa; sua atividade é afetada tanto pela lesão aguda da célula hepática quanto pela obstrução do trato biliar (RAVEL, 1997). Além da colestase, a γ -GT encontra-se elevada nas lesões hepáticas inflamatórias e nos casos em que a atividade do citocromo P-450 tenha sido induzida pelo álcool ou várias outras substâncias tóxicas. Por essa razão, é útil no diagnóstico do uso abusivo de álcool e outras drogas (COLICHON; TOREZAN FILHO; STRAUSS, 2001).

Indivíduos obesos podem apresentar níveis de γ -GT até 50% superiores aos encontrados em indivíduos eutróficos. Além disso, podem ser observadas elevações transitórias em processos reparadores extensos em qualquer parte do corpo (RAVEL, 1997).

No caso da γ -GT, os valores médios não apresentaram grande disparidade entre os grupos de animais, como ocorreu com a FA (tabela 1, p. 55). Além disso, ao assumir

que os níveis de γ -GT do soro de ratos normais situam-se próximos do intervalo de normalidade para humanos para o método particular empregado (Synermed®), 12 a 64U/L, conclui-se que os animais de todos os grupos estudados apresentaram níveis normais dessa enzima. Vale lembrar que, no caso das aminotransferases, ratos normais apresentam valores próximos ou acima do limite superior para humanos (RINGLER; DABICH, 1979).

Foram estudadas as correlações entre γ -GT e graus de esteatose hepática, relação peso do fígado/peso corporal, peso corporal, FA e AST. Na lesão hepatocelular aguda, a frequência de elevação da atividade da γ -GT é próxima daquela observada para a AST (RAVEL, 1997), o que justifica a inclusão da AST nessa análise. Em nenhum dos casos foi observada correlação entre as variáveis. A ausência de tais correlações descarta a influência das alterações hepáticas observadas neste estudo sobre os níveis séricos de γ -GT encontrados. Adicionalmente, os níveis de γ -GT observados são sugestivos de ausência de transtornos biliares, apesar dos níveis elevados de FA.

Além das provas diretas de dano celular, analisadas até o momento, este estudo incluiu a determinação sorológica de albumina, uma prova indireta de injúria celular, que mede a diminuição da capacidade de síntese do hepatócito (COLICHON; TOREZAN FILHO; STRAUSS, 2001).

Quantitativamente a albumina é a maior proteína sérica, tanto no homem quanto no rato (RINGLER; DABICH, 1979). Ela desempenha inúmeras funções biológicas vitais, tanto no transporte de diferentes substâncias orgânicas, íons metálicos, ácidos graxos, bilirrubina, drogas ou produtos tóxicos, dentre outras, quanto na manutenção da pressão oncótica do plasma.

A síntese de albumina se dá unicamente no fígado. A maioria das doenças hepáticas destrutivas graves, agudas ou crônicas, resulta em redução dos níveis séricos de albumina (RAVEL, 1997), embora ingestão proteica deficiente ou perdas excessivas renais ou intestinais, possam produzir o mesmo efeito (COLICHON; TOREZAN FILHO; STRAUSS, 2001).

De um modo geral, a albuminemia tem uso limitado como marcadora da função sintética do fígado nas situações agudas, uma vez que sua meia-vida plasmática é de

cerca de dezessete dias. Por essa razão, a hipoalbuminemia aparece especialmente nas hepatopatias crônicas, como na cirrose e nas neoplasias malignas (CÂMARA FILHO; DE SOUZA, 2000).

Todos os grupos de animais aqui estudados apresentaram níveis normais de albumina sérica (tabela 1, p. 55). De um modo geral, os níveis séricos de albumina em ratos variam entre 3 e 5g/dL (RINGLER; DABICH, 1979; MITRUKA; RAWNSLEY, 1977). As diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significativas.

Tal achado bioquímico é indicativo de ausência de diminuição da capacidade de síntese do hepatócito, com preservação da função hepática, apesar das alterações observadas nos animais dos grupos controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50%. Como era de se esperar, considerando os resultados apresentados, o estudo de correlação entre albumina sérica e graus de esteatose hepática mostrou ausência de correlação entre essas variáveis.

Os teores de proteínas séricas totais, por sua vez, foram significativamente maiores nos animais do grupo controle dois ($p < 0,01$) (tabela 1, p. 55). No entanto, os animais dos grupos controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50% apresentaram níveis séricos de proteínas totais dentro dos padrões esperados (4,7 a 8,15 g/dL; MITRUKA; RAWNSLEY, 1977) e os animais do grupo controle dois, pouco acima desses valores.

A determinação dos níveis séricos de proteínas totais e de suas frações é de grande importância clínica, pois a concentração protéica total no plasma é responsável pela sua pressão coloidosmótica, enquanto que as variações observadas nas diversas frações auxiliam no diagnóstico de doenças específicas. Alterações dos níveis séricos da albumina e das globulinas são especialmente importantes nos distúrbios nutritivos, nas hepatopatias, na nefrose, no mieloma múltiplo, nas imunoglobulinopatias e nas infecções crônicas. Níveis elevados de proteínas totais ocorrem nas infecções crônicas, doenças hepáticas, doenças auto-imunes e desidratação, dentre outras (MILLER; GONÇALVES, 1999).

Os valores de proteínas séricas totais variam, conforme o método aqui adotado (Synermed®), de acordo com a idade, o sexo e a dieta consumida. Uma vez que os animais eram todos de mesma idade (10 meses ao sacrifício) e sexo, resta a variável dieta a ser analisada.

De fato, as dietas dos grupos controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50% apresentavam composição diferente daquela consumida pelos animais do grupo controle dois. As primeiras tinham a caseína, suplementada com aminoácido sulfurado, como fonte protéica, nos teores de 20% e 14% (g/Kg de dieta) para o período de crescimento e idade adulta dos animais, respectivamente. A segunda, por sua vez, apresentava em sua composição farinha de peixe suplementada com aminoácido, com proporção protéica bruta de 21%, do desmame até a idade adulta. Convém ressaltar que as dietas oferecidas aos animais dos grupos controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50% enquadravam-se na categoria de dietas purificadas, enquanto que a dieta do grupo controle dois, comercial (Labina®), na categoria de dietas não refinadas, não purificadas ou baseadas em cereal, de acordo com o *American Institute of Nutrition* (1977).

Diferentes proporções de proteínas dietéticas são recomendadas para o período de crescimento e para a idade adulta de roedores, em atenção às necessidades de aminoácidos essenciais próprias de cada fase da vida desses animais (REEVES, 1997). Os teores protéicos empregados nas dietas controle e experimentais foram resultado da escolha da caseína como fonte protéica nas dietas AIN-93, porque apresenta composição em aminoácidos razoavelmente adequada, é de fácil obtenção e de custo relativamente baixo.

A substituição da caseína por outra fonte protéica pode exigir modificações na composição das dietas para atender às necessidades de aminoácidos essenciais dos animais. Tais modificações, portanto, devem estar em consonância com as demandas nutricionais nos diferentes períodos da vida, para não provocar deficiências em situações de maior necessidade (crescimento, gestação, lactação) ou sobrecarregar o organismo com excesso de excretas nitrogenadas nos períodos de menor necessidade (manutenção).

O fato dos animais do grupo controle dois terem sido alimentados com dieta cujo teor protéico bruto era de 21%, não só na fase de crescimento como também na idade adulta, poderia ter contribuído com as diferenças entre os níveis de proteínas séricas totais aqui observadas.

A ausência de transtornos relacionados à qualidade protéica das dietas elaboradas neste estudo deve, também, ser considerada, uma vez que os níveis

séricos de albumina e de proteínas totais nos grupos controle e experimentais estavam dentro dos limites normais. Além disso, o coeficiente de eficiência protéica (CEP), discutido no item 3.2, não sugeriu limitações na qualidade protéica das dietas consumidas por tais grupos.

Pelo exposto, parece razoável concluir pela contribuição da composição protéica das dietas na determinação dos níveis séricos de proteínas totais, neste estudo.

Estudos de correlação entre proteínas séricas totais e graus de esteatose hepática, relação peso do fígado/peso corporal e peso corporal final dos animais, também foram realizados. A razão disso é que o quadro de esteatose macrovesicular aqui observado pode, também, ser provocado por transtornos na mobilização dos lipídios hepáticos por prejuízo na síntese de apolipoproteínas, em especial da apolipoproteína B 100 (GAYOTTO; VIANNA; LEITÃO, 2001). Nestas análises, optou-se por agrupar os animais dos grupos controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50%, que apresentaram variados graus de esteatose hepática, apesar dos níveis adequados de proteínas séricas totais. A inclusão dos animais do grupo controle dois poderia comprometer a análise, induzindo uma correlação falsa, pois os mesmos apresentaram níveis significativamente maiores de proteínas totais e ausência de esteatose hepática.

Observou-se correlação negativa fraca significativa entre proteínas séricas totais e peso corporal ($r=-0,39$; $p<0,05$) e ausência de correlação nos demais casos. Em virtude da ausência de correlação com graus de esteatose hepática e relação peso do fígado/peso corporal, a correlação aqui observada não parece apresentar significado fisiológico importante.

Em resumo, as determinações bioquímicas de AST, ALT e FA dos animais aqui estudados foram sugestivas de dano hepatocelular. No entanto, a influência do consumo do óleo experimental sobre os níveis séricos dessas enzimas deve ser descartada, uma vez que até mesmo os animais do grupo controle e, em menor proporção, do grupo controle dois, apresentaram níveis séricos elevados. Além disso, os animais dos grupos experimentais, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50%, não apresentaram níveis séricos superiores aos outros animais; as diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significativas. Foram observadas correlações positivas fracas entre tais

parâmetros bioquímicos e os variados graus de esteatose hepática apresentados pelos animais (0 a 5), o que permitiu uma associação direta entre tais variáveis.

Os níveis séricos de proteínas totais dos animais do grupo controle dois foram significativamente superiores aos apresentados pelos outros animais. As diferenças entre os teores protéicos das dietas controle e experimentais e da ração comercial Labina® parecem ter sido decisivas na determinação dos níveis observados.

As demais provas bioquímicas de injúria hepática aqui realizadas apresentaram níveis normais em todos os animais estudados.

3.4.2 Provas de função renal

Segundo Ravel (1997), as provas de função renal são divididas em três categorias gerais: 1) provas predominantemente de função glomerular, 2) provas que refletem lesão glomerular e/ou tubular grave e, 3) provas de função predominantemente tubular. Neste trabalho foram determinados os níveis séricos de uréia, creatinina e ácido úrico (tabela 1, p. 55), provas de função renal enquadradas na segunda categoria.

A síntese de uréia ocorre quase que exclusivamente no fígado e representa o destino da maior parte da amônia que chega a este órgão. A amônia, metabólito tóxico, é produzida no metabolismo dos L-aminoácidos, que se inicia com as reações de transaminação catalisadas pelas aminotransferases. Nessas reações, os grupos amino de muitos aminoácidos são coletados na forma de L-glutamato, que os conduz para serem utilizados em vias biossintéticas ou sofrerem reações de formação de produtos nitrogenados para excreção. Em muitos tecidos extra-hepáticos, inclusive o cérebro, o L-glutamato é combinado enzimaticamente com a amônia para formar L-glutamina, um composto neutro, atóxico, que pode atravessar facilmente as membranas celulares e chegar até o fígado, através do sangue (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

O aminoácido alanina também desempenha um papel importante no transporte de grupos amino dos músculos para o fígado, numa forma atóxica, através do ciclo da glicose-alanina. O nitrogênio em excesso que chega ao fígado oriundo da glutamina ou da alanina pode ser liberado como amônia na mitocôndria hepática, onde é convertida à uréia, através do ciclo da uréia (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

Portanto, a uréia é a principal forma de excreção do nitrogênio oriundo do catabolismo protéico. É filtrada nos glomérulos renais e parcialmente reabsorvida (cerca de 40%) nos túbulos, por difusão retrógrada. Quando os rins não a depuram suficientemente, ela se acumula no sangue. Por essa razão, na presença de função hepática razoável, a determinação dos níveis séricos de uréia constitui o recurso mais utilizado para uma avaliação grosseira do estado de funcionamento dos rins (RAVEL, 1997; MILLER; GONÇALVES, 1999).

Níveis séricos elevados de uréia podem ter origem pré-renal, renal ou pós-renal. Na uremia pré-renal, estão envolvidos dois mecanismos básicos: a diminuição do fluxo sanguíneo renal impedindo a filtração glomerular (insuficiência cardíaca, desidratação) e a superprodução de resíduos nitrogenados (dieta com alto teor de proteína, hemorragia do trato gastrintestinal, degradação protéica extensa). Dentre as causas renais, caracterizadas pela presença de doença renal intrínseca que afeta a função glomerular ou tubular, situam-se a glomerulonefrite aguda, a nefrite crônica, o rim policístico, a nefrosclerose e a necrose tubular, dentre outras. As causas pós-renais, por sua vez, são constituídas por qualquer tipo de obstrução urinária acentuada que interfere na remoção da uréia devido à pressão retrógrada (RAVEL, 1997; MILLER; GONÇALVES, 1999). Níveis reduzidos de uréia podem ocorrer na doença hepática, na super-hidratação e na má nutrição.

A creatinina, por sua vez, é formada no músculo pela remoção irreversível e não enzimática de água da fosfocreatina. Esta, derivada da creatina, é um importante reservatório energético do músculo esquelético. Em condições fisiológicas, a reação de hidrólise da fosfocreatina gerando creatina e fosfato inorgânico (cujo aceptor é o ADP), permite o suprimento de ATP para o músculo, enquanto as suas reservas são utilizadas como fonte de energia para a contração muscular. Quando o ATP é abundante, a reação inversa pode ocorrer permitindo o aumento da concentração de fosfocreatina. Dessa forma, é gerado um sistema de armazenamento de fosfato de alta energia (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000; MURRAY et al., 2002).

A creatinina é o principal produto residual do metabolismo da creatina pelo músculo. É eliminada por filtração glomerular sem reabsorção tubular significativa. Além disso, quando os níveis plasmáticos se elevam, os rins podem excretá-la por excreção

tubular ativa. Portanto, a elevação dos níveis séricos de creatinina é, em geral, mais tardia do que a de uréia, sugerindo cronicidade (MILLER; GONÇALVES, 1999).

Uma vez que a creatinina sérica provém do metabolismo muscular, seus níveis dependem da massa muscular corporal. As taxas de creatinina também sofrem influência da ingestão de alimentos, especialmente de carnes. Por isso, há uma redução da creatinina sérica à medida que a idade avança ou na perda de massa muscular de outra origem e no consumo de dietas pobres em carne. Tais situações podem mascarar uma elevação do nível sérico de creatinina por doença renal. Uma redução de 50% na taxa de filtração glomerular produz um aumento aproximado de duas vezes dos níveis séricos de uréia ou de creatinina, observando-se o inverso quando a taxa de filtração glomerular está elevada (RAVEL, 1997).

Em ratos, a uréia plasmática não varia com a idade ou o sexo. Os níveis séricos de creatinina de ratos jovens, no entanto, são maiores nos machos que nas fêmeas, mas, na idade adulta, as diferenças desaparecem (RINGLER; DABICH, 1979).

O ácido úrico é o produto de excreção final do catabolismo das purinas nos primatas. Parte do ácido úrico excretado provém das purinas ingeridas e parte da renovação dos nucleotídeos purínicos dos ácidos nucléicos. O produto de excreção do catabolismo das pirimidinas é, em geral, a uréia. Os nucleotídeos estão presentes em todas as células onde desempenham numerosas funções vitais. Eles são precursores do DNA e do RNA, dos transportadores de energia química ATP e GTP, dos cofatores NAD, FAD, coenzima A e S-adenosilmetionina, dos mensageiros celulares secundários cAMP e cGMP, dentre outros (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

O ácido úrico plasmático é filtrado pelos glomérulos renais e, em seguida, reabsorvido ativamente pelos túbulos proximais, na proporção aproximada de 90%. O teor plasmático é muito influenciado por fatores extra-renais, o que limita a sua aplicação no diagnóstico de doença renal, embora a diminuição do funcionamento dos rins seja freqüentemente acompanhada pelo aumento dos níveis séricos de ácido úrico. A hiperuricemia é observada na gota, no aumento do metabolismo das nucleoproteínas, como na leucemia e na policitemia, e no quadro de hiperuricemia idiopática familiar (MILLER; GONÇALVES, 1999).

Adotando-se os valores de referência para os níveis séricos de uréia, creatinina e ácido úrico para ratos *Wistar* machos adultos de 5 a 29 mg/dL, 0,2 a 0,8 mg/dL e 1,2 a 7,5 mg/dL, respectivamente (MITRUKA; RAWNSLEY, 1977), os animais dos grupos controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50% apresentaram níveis séricos normais desses parâmetros bioquímicos. O grupo controle dois, no entanto, apresentou níveis elevados de uréia plasmática, significativamente superiores aos observados nos demais grupos. Observou-se, ainda, diferença significativa entre os níveis séricos de ácido úrico dos grupos controle dois e TAGC₇ 50% (tabela 1, p. 55).

Uma vez que os animais do grupo controle dois apresentaram níveis séricos de proteínas totais significativamente superiores aos observados nos demais grupos, possivelmente em consequência do consumo de quantidades elevadas de proteínas na dieta, conforme discutido anteriormente, era de se esperar diferenças igualmente significativas entre os níveis séricos de uréia. Vale lembrar que a uremia pré-renal pode ser provocada pela superprodução de resíduos nitrogenados, como aquela observada em dietas hiperprotéicas. Além disso, níveis séricos elevados de uréia foram igualmente observados em ratas *Wistar* adultas, aparentemente normais, alimentadas com o mesmo tipo de ração comercial (Labina®) consumida pelos animais do grupo controle dois (BARBOSA et al., 1998).

Face ao exposto e considerando os níveis adequados de creatinina sérica apresentados por todos os animais do estudo, parece razoável concluir pela ausência de dano renal. De qualquer forma, pode-se descartar um possível efeito tóxico do óleo experimental sobre os rins, pois os animais dos grupos experimentais apresentaram provas de função renal compatíveis com estado de bom funcionamento desses órgãos.

Apesar das diferenças observadas entre os níveis séricos de ácido úrico, as mesmas não parecem ter significado fisiológico importante, uma vez que todos os animais apresentaram-se dentro dos padrões de normalidade. Isso vem se somar aos argumentos favoráveis à ausência de dano renal, neste estudo.

3.4.3 Perfil lipídico

Os lipídios mais importantes do ponto de vista fisiológico e clínico presentes no plasma são os ácidos graxos, os triacilgliceróis, os fosfolipídios e o colesterol. Dada a insolubilidade dos lipídios em água e na maioria dos líquidos biológicos, eles dependem de proteínas para o seu transporte. As lipoproteínas, constituídas de lipídios e proteínas em proporções variadas, são os agregados moleculares responsáveis pelo transporte da maioria dos lipídios no plasma. Os ácidos graxos livres, por sua vez, são transportados ligados à albumina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2001).

Pelo menos nove proteínas diferentes, denominadas apolipoproteínas (apo), são encontradas entre as lipoproteínas do plasma humano. Além de conferirem solubilidade ao complexo, as apolipoproteínas agem como sinalizadoras, dirigindo as lipoproteínas para tecidos específicos (apoB-100, apoE) e regulando a atividade de enzimas que agem sobre elas (apoA-I, apoC-II, apoC-III) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

Existem quatro grandes classes de lipoproteínas: os quilomicrons, as lipoproteínas de densidade muito baixa (*very low density lipoprotein* - VLDL), as lipoproteínas de densidade baixa (*low density lipoprotein* - LDL) e as lipoproteínas de densidade alta (*high density lipoprotein* - HDL).

Os quilomicrons, responsáveis pelo transporte de lipídios dietéticos (exógenos), possuem uma camada externa delgada de fosfolipídios, colesterol não esterificado e proteínas, principalmente apolipoproteínas B-48, C-II e E. O núcleo central é constituído por triacilgliceróis e ésteres de colesterol. Apresentam composição média de 85% de triacilgliceróis, 5% de colesterol, 5% de fosfolipídios e 2% de proteínas. São produzidos no retículo endoplasmático liso das células epiteliais que recobrem a superfície interna do intestino delgado e movem-se, inicialmente através do sistema linfático, até o fígado. A apoC-II ativa a lipase lipoprotéica nos capilares dos tecidos adiposo, cardíaco, músculo esquelético e glândula mamária em lactação, levando à liberação de ácidos graxos para estes tecidos. Os quilomicrons remanescentes, desprovidos da maior parte de seus triacilgliceróis, são removidos pelo fígado por receptores específicos, principalmente o receptor da LDL (RAVEL, 1997; LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

No fígado, os ácidos graxos não utilizados como combustível são convertidos em triacilgliceróis. Estes, combinados com as apolipoproteínas B-100, C-I, C-II, C-III e E, constituem as VLDL. Do ponto de vista estrutural, as VLDL são semelhantes aos quilomicrons; sua composição média é de 60% de triacilgliceróis, 15% de colesterol, 15% de fosfolipídios e 10% de proteínas. O excesso de carboidratos da dieta também pode ser convertido em triacilgliceróis no fígado e transportado como VLDL. Portanto, as VLDL são responsáveis pelo transporte de lipídios endógenos. A exemplo do que ocorre com os quilomicrons, parte do conteúdo de triacilgliceróis das VLDL é perdido na passagem pelos capilares dos tecidos extra-hepáticos. Os remanescentes resultantes são denominados lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), que têm dois destinos: parte é captada pelo fígado e parte é convertida em LDL (STRYER, 1992; RAVEL, 1997; LEHNINGER; NELSON; COX, 2000; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2001).

A perda de triacilgliceróis e a troca dos mesmos por ésteres de colesterol com as HDL e as LDL, através da proteína de transferência de colesterol esterificado, convertem as VLDL em LDL, passando por IDL. Muito rica em colesterol e ésteres de colesterol, a LDL transporta colesterol para os tecidos extra-hepáticos, os quais possuem receptores de superfície que reconhecem a apoB-100, sua apolipoproteína. Por essa razão, acredita-se que as LDL desempenham papel importante no fornecimento de colesterol às células corporais, contribuindo para o processo aterogênico (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2001).

A composição média das LDL é de 45% de colesterol, 10% de triacilgliceróis, 20% de fosfolipídios e 25% de proteínas. Tanto as VLDL como as LDL são removidas pelo fígado através de ligação com receptores específicos, principalmente o receptor da LDL. A expressão desses receptores é a principal responsável pelos níveis de colesterol no sangue e depende da atividade da enzima hidróxi-metil-glutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase), que catalisa o passo limitante na síntese do colesterol hepático: a conversão do β -hidróxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA) em mevalonato (RAVEL, 1997; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2001).

As HDL, por sua vez, são sintetizadas no fígado e no intestino. Apresentam composição média de 50% de proteínas, 15% de colesterol, 5% de triacilgliceróis e 30%

de fosfolipídios. Suas apolipoproteínas são apoA-I, apoA-II, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoD e apoE. A apoA-I é responsável pela ativação da enzima lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), presente no fígado e na superfície da HDL, que catalisa a reação de esterificação do colesterol. Depois de sintetizada e liberada na corrente sanguínea, a HDL coleta colesterol e ésteres de colesterol de outras lipoproteínas circulantes. A LCAT esterifica o colesterol, que passa a compor o núcleo central da HDL junto aos demais ésteres de colesterol coletados, convertendo-a em lipoproteína madura. A seguir, a HDL volta ao fígado para descarregar o colesterol onde é metabolizado. Por esta razão, as HDL desempenham duas funções contrastantes no processo aterogênico: ajudam a formar LDL a partir das VLDL, aumentando o risco e promovem o transporte reverso do colesterol (de volta ao fígado), contribuindo para a sua prevenção (RAVEL, 1997; LEHNINGER; NELSON; COX, 2000; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2001).

As LDL, assim como as VLDL e as HDL, não são compostas de partículas homogêneas. Elas apresentam subclasses distintas que diferem em tamanho, densidade e composição química. Em relação às subclasses da LDL, os indivíduos podem ter predominância de partículas grandes, menos densas (fenótipo A) ou pequenas, mais densas (fenótipo B). O segundo está associado a níveis plasmáticos elevados de triacilgliceróis, níveis reduzidos de HDL e maior risco de doença arterial coronariana (DAC), quando comparado com o primeiro. Embora o fenótipo B seja determinado geneticamente, ele sofre forte influência de outros fatores como: sexo, idade, obesidade abdominal e concentração de gorduras e carboidratos da dieta. A redução dos níveis plasmáticos de colesterol e triacilgliceróis pode modificar o perfil das subclasses de LDL, promovendo um aumento da concentração das partículas maiores e redução das menores.

As alterações do perfil lipídico, definido pelas determinações do colesterol total, colesterol HDL (HDLc), triacilgliceróis e colesterol LDL (LDLc), são definidas como dislipidemias. Elas recebem classificação laboratorial e etiológica. Classificação laboratorial: 1. hipercolesterolemia isolada: aumento do colesterol total e/ou do LDLc; 2. hipertrigliceridemia isolada: aumento dos triacilgliceróis; 3. hiperlipidemia mista: aumento do colesterol total e dos triacilgliceróis; e, 4. diminuição isolada do HDLc ou

associada ao aumento dos triacilgliceróis ou do LDLc. Classificação etiológica: 1. dislipidemias primárias: de origem genética; e, 2. dislipidemias secundárias: causadas por outras doenças ou uso de medicamentos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2001).

O LDLc é considerado fator causal e independente de aterosclerose. Apresenta melhor correlação com o risco da doença do que o nível de colesterol sérico total. O poder de previsão de risco e a meta lipídica a ser adotada para a prevenção dependem da associação dos níveis elevados de LDLc (>160 mg/dL para indivíduos maiores de 20 anos de idade) com outros fatores de risco, tais como fumo, hipertensão arterial sistêmica, níveis reduzidos de HDLc, *diabetes mellitus*, idade (≥ 45 anos para homens e ≥ 55 anos para mulheres) e história familiar precoce de aterosclerose.

Em função da dificuldade de isolar e medir as LDL, o método padrão consiste em determinar o LDLc através da fórmula de Friedewald (colesterol LDL = colesterol total – colesterol HDL – triacilgliceróis/5), que não deve ser utilizada se o nível de triacilgliceróis for superior a 400mg/dL (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972).

O colesterol sérico total, por sua vez, representa o colesterol presente nas várias lipoproteínas. Há forte correlação entre níveis elevados de colesterol sérico (≥ 240 mg/dL para indivíduos maiores de 20 anos de idade) e tendência aumentada para aterosclerose. Apesar dos níveis plasmáticos de colesterol sofrerem influência do teor de colesterol da dieta, a quantidade de gordura saturada exerce um efeito maior sobre a colesterolemia. Os ácidos graxos saturados (AGS) reduzem os receptores celulares responsáveis pela remoção da LDL plasmática e permitem maior acúmulo de colesterol nessa lipoproteína. Portanto, a ingestão de gordura saturada é a principal causa alimentar de elevação do colesterol plasmático (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2001; GILANI et al., 2002).

A substituição isocalórica de ácidos graxos saturados por ácidos graxos polinsaturados (AGPI), reduz os níveis plasmáticos de colesterol total e de LDLc. Os AGPI diminuem a produção, aumentam a remoção e alteram a estrutura da LDL, com conseqüente redução do seu conteúdo de colesterol. No entanto, os AGPI baixam os níveis plasmáticos de HDLc e induzem maior oxidação lipídica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2001).

Os ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), em contrapartida, reduzem o colesterol sérico sem diminuir o HDLc e provocar oxidação lipídica. Eles estão presentes nos óleos de oliva e de canola, na azeitona, no abacate e nas oleaginosas (castanhas, nozes, amêndoas). Os ácidos graxos insaturados com configuração *trans*, produzidos na hidrogenação de óleos vegetais no processo de fabricação de margarinas, elevam a colesterolemia. Além disso, elevam o LDLc e reduzem o HDLc, aumentando o risco de aterosclerose (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2001).

Os níveis séricos de HDLc apresentam uma forte correlação negativa com o risco de coronariopatia aterosclerótica, independente dos níveis de LDLc ou de colesterol total. Os níveis séricos variam de acordo com a idade e o sexo, sendo considerados baixos os valores inferiores a 40mg/dL para indivíduos acima de 20 anos de idade (RAVEL, 1997).

Exercícios físicos tanto podem reduzir os triacilgliceróis séricos quanto aumentar o HDLc. Além disso, determinam melhora da condição cardiorrespiratória e da composição corporal, redução do peso corporal, do estresse e do nível de catecolaminas e exercem efeito benéfico sobre a pressão arterial. Por essas razões, o sedentarismo constitui fator de risco para a aterosclerose (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2001).

A relação colesterol sérico total/HDLc pode ser utilizada como forma de visualizar a contribuição conjunta desses dois fatores de risco. A relação para risco normal é de 5, para risco duplo 10 e para risco triplo, 20. No entanto, ainda não há consenso sobre a sua importância como indicador de risco de coronariopatia. Os argumentos menos favoráveis ao seu uso sugerem que a relação não demonstra adequadamente as contribuições independentes dos dois fatores relacionados. No entanto, foi observado que a relação apoA-I (exclusivamente associada às HDL)/apoB, muitas vezes considerada o melhor indicador de coronariopatia, fornece aproximadamente a mesma avaliação de risco dada pela relação colesterol total/HDLc (RAVEL, 1997).

Os triacilgliceróis plasmáticos são encontrados nos quilomicrons e nas VLDL. No jejum, os quilomicrons estão ausentes de modo que a determinação dos triacilgliceróis nesta condição fornece uma estimativa das VLDL.

Há uma relação inversa entre os níveis de triacilgliceróis e de HDL, sugerindo risco aumentado de coronariopatia na hipertrigliceridemia. A obesidade, o estresse agudo intenso, a gravidez, a ingestão de álcool, as dietas com elevado teor de gorduras e várias doenças, aumentam os níveis de triacilgliceróis (RAVEL, 1997). Valores séricos inferiores a 150mg/dL para indivíduos acima de 20 anos de idade são considerados ótimos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2001).

Os ácidos graxos polinsaturados da série ω -3 (α -linolênico, eicosapentaenóico - EPA, docosaexaenóico - DHA) diminuem a trigliceridemia reduzindo a secreção hepática de VLDL. Além disso, aumentam o catabolismo das VLDL e reduzem a síntese de apolipoproteína B, de LDL e a lipemia pós-prandial (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2001; ÁGUILA et al., 2002). Por estas razões o consumo de AGPI da série ω -3 tem sido recomendado na prevenção de aterosclerose.

Há uma similaridade geral entre o sistema cardiovascular dos ratos e de outros mamíferos, inclusive o homem. Apesar disso, é difícil produzir hiperlipidemia e aterosclerose experimentais em ratos normais. Com o auxílio de dietas especiais, no entanto, pode-se induzir um aumento nos níveis séricos de colesterol, hipertensão arterial ou doenças renais. Por essas razões, o modelo experimental com ratos tem se mostrado adequado (ÁGUILA et al., 2002).

As principais alterações observadas no perfil lipídico dos animais aqui estudados residem nos níveis séricos de colesterol total e de LDLc. Os animais do grupo controle dois apresentaram níveis séricos desses dois parâmetros bioquímicos significativamente maiores que aqueles dos demais grupos (tabela 1, p. 55). Não foram observadas diferenças significativas nos demais parâmetros analisados.

Apesar da dieta oferecida ao grupo controle dois apresentar composição diferente das demais, o seu teor lipídico era semelhante ao das dietas controle e experimentais da fase adulta dos animais (próximo de 4%, g/Kg de dieta). No entanto, em função da presença de alimentos de origem animal (farinha de peixe), a ração comercial Labina® certamente continha colesterol, além de níveis de ácidos graxos saturados presumivelmente mais elevados que as dietas controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50%. Apesar do mesmo teor de lipídios totais, há fortes evidências de que a composição lipídica, mais que a quantidade total de lipídios da dieta, é fator

determinante dos níveis séricos de colesterol total e da relação LDLc/HDLc, importantes fatores de risco de doença cardiovascular (GILANI et al., 2002).

A simples presença de colesterol em dietas experimentais, apesar de apresentar menor poder de previsão de risco aterosclerótico que a concentração de AGS, parece reduzir a atividade do receptor de LDL, limitando a remoção de LDL da circulação, com conseqüente elevação dos níveis de colesterol (GILANI et al., 2002).

O aumento da oferta de AGS, sem o aumento concomitante do teor de AGPI, reduz a relação AGPI/AGS contribuindo com a elevação dos níveis séricos de colesterol total. De maneira inversa, a redução isocalórica de AGS dietéticos tem se mostrado eficiente na redução dos níveis de colesterol total e LDLc. No entanto, no estudo de Águila et al. (2002), a razão AGPI/AGS não apresentou correlação com lipídios séricos, em ratos.

Uma vez que não havia fontes abundantes de ácidos graxos monoinsaturados em nenhuma das dietas aqui estudadas, a relação (AGPI+AGMI)/AGS, considerada atualmente a melhor indicadora do efeito dos lipídios dietéticos sobre os lipídios séricos, não traz nenhuma contribuição adicional a discussão.

O consumo dos AGS láurico (12:0), mirístico (14:0) e palmítico (16:0) tem sido associado à elevação dos níveis de colesterol total, triacilgliceróis, LDLc e colesterol hepático, em ratos. No entanto, tal efeito só foi observado quando a dieta continha colesterol e quantidades reduzidas de ácido graxo linoléico (18:2) (<3% das calorias totais). Quando a ingestão de 18:2 é suficientemente grande, é extremamente difícil demonstrar o efeito das gorduras saturadas ou do colesterol dietético sobre os lipídios circulantes (GILANI et al., 2002). No entanto, um excesso de 18:2 pode determinar deficiência dos ácidos graxos EPA e DHA, importantes na manutenção do perfil lipídico adequado (WAITZBERG; BORGES, 2000).

Embora a ração comercial Labina® não seja enriquecida com o ácido graxo linoléico, a mesma apresenta óleo de soja em sua composição (quantidade não declarada), uma fonte alimentar desse ácido graxo. Resta saber se a quantidade de 18:2 era suficientemente grande nesta ração comercial para prevenir as alterações no perfil lipídico. Pelo observado nos animais do grupo controle dois, parece que não.

Os lipídios forneceram 16% e 9% das calorias totais das dietas aqui elaboradas para as fases de crescimento e idade adulta dos animais, respectivamente. O óleo de soja, fonte exclusiva de lipídios da dieta controle, possui aproximadamente metade de seus ácidos graxos na forma de ácido linoléico. Além do seu conteúdo em óleo de soja, as dietas experimentais foram suplementadas com AGPI (linoléico e α -linolênico) de modo a atender às recomendações nutricionais dos animais. A partir dessas considerações, pode-se concluir que as dietas controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50% encerravam mais de 3% de suas calorias como ácido linoléico sem, no entanto, apresentar quantidades elevadas do mesmo. Além disso, nenhuma delas continha fonte alimentar de 12:0, 14:0 e colesterol. E, como o consumo de 16:0, presente no óleo de soja, parece só estar relacionado às alterações do perfil lipídico, em ratos, na presença concomitante de colesterol (GILANI et al., 2002), a soma de todos esses fatores provavelmente contribuiu com o perfil lipídico apresentado pelos animais dos grupos controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50%.

A substituição parcial do óleo de soja pelo óleo experimental aumentou o teor de ácidos graxos de cadeia média (AGCM) nas dietas TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50%, em relação à dieta controle. No entanto, o perfil lipídico sérico dos animais não diferiu significativamente com tal mudança na composição lipídica da dieta. Esse achado permitiu concluir que, nas condições aqui adotadas, o consumo prolongado do óleo experimental não induziu alterações no perfil lipídico de ratos, quando comparado àquele promovido pelo óleo tradicionalmente utilizado em dietas experimentais.

Chanez et al. (1991), estudando os efeitos metabólicos de triacilgliceróis de cadeia média (TCM), em ratos *Wistar* adultos machos alimentados com dieta com 32% do aporte calórico como lipídios, também não observaram diferenças significativas nos níveis séricos de colesterol total e triacilgliceróis, além de glicose, ácidos graxos livres e glicerol, quando comparados com ratos alimentados com triacilgliceróis de cadeia longa (TCL).

Noutro estudo, Hill et al. (1990) observaram redução dos níveis séricos de colesterol total após seis dias de consumo de dieta hipercalórica, com 40% das calorias oriundas do óleo de soja, em humanos não obesos. A substituição do óleo de soja por

TCM (61% ácido caprílico, 8:0, e 32% ácido cáprico, 10:0), no entanto, não produziu qualquer efeito sobre os níveis de colesterol total.

O consumo de proteínas de origem animal também tem sido relacionado com o aumento dos níveis de colesterol e com a aterosclerose, quando comparado com o consumo de proteínas de origem vegetal. Gilani et al. (2002) observaram níveis séricos de colesterol total e triacilgliceróis mais elevados em ratos *Sprague Dawley* machos adultos alimentados com caseína, que naqueles alimentados com gelatina.

A proteína da soja também tem sido associada à redução dos níveis séricos de colesterol total e triacilgliceróis, quando comparada à caseína. O mecanismo envolvido parece ser uma redução da absorção de esteróides no trato gastrointestinal, incluindo o colesterol dietético e os sais biliares, por ligação com os mesmos e excreção. Sua ação parece também estar ligada à ativação direta de receptores hepáticos de LDL (GILANI et al., 2002).

Uma questão interessante relacionada ao efeito das proteínas dietéticas sobre o perfil lipídico sérico diz respeito ao padrão de aminoácidos dessas proteínas. Foram observadas correlações positivas significativas entre colesterol sérico total e metionina, relação metionina/glicina e lisina/arginina, tirosina, ácido glutâmico e prolina, em ratos alimentados com dietas sem colesterol. Em contrapartida, correlações negativas significativas com os aminoácidos cistina e alanina (GILANI et al., 2002).

As fontes protéicas de todas as dietas aqui discutidas eram de origem animal: farinha de peixe suplementada com metionina e lisina para o grupo controle dois e caseína suplementada com L-cistina para os demais grupos. Por essa razão, não era de se esperar grande influência da proteína da dieta sobre o perfil lipídico sérico dos animais. No entanto, os padrões de suplementação com aminoácidos, associados às diferenças de composição lipídica das dietas, podem ter contribuído com os resultados aqui observados. Contudo, essa hipótese precisa ser confirmada.

Apesar dos níveis significativamente mais elevados de colesterol total e LDLc nos animais do grupo controle dois, as relações colesterol total/HDLc e LDLc/HDLc, não diferiram entre os diversos grupos. Os valores médios da relação colesterol total/HDLc foram 6,0, 5,7, 5,9 e 6,6, para os grupos controle, TAGC7 30%, TAGC7 50% e controle dois, respectivamente, pressupondo risco semelhante de doença coronariana

aterosclerótica entre os grupos. No entanto, como a sua determinação falha na demonstração das contribuições independentes de cada um dos fatores, a relação pode não sugerir o verdadeiro grau de anormalidade. Os valores médios da relação LDLc/HDLc, por sua vez, foram 4,0, 3,7, 3,9 e 5,9, para os grupos controle, TAGC7 30%, TAGC7 50% e controle dois, respectivamente.

A observação de correlação positiva altamente significativa entre os níveis séricos de colesterol total e de HDLc, no conjunto dos animais de todos os grupos estudados (gráfico 9 A), foi decisiva para os resultados obtidos no estudo da relação colesterol total/HDLc. Esse fato favoreceu principalmente os animais do grupo controle dois, que apresentaram níveis significativamente mais elevados de colesterol total e de LDLc. Vale lembrar que os níveis de HDLc guardam correlação negativa significativa com coronariopatia aterosclerótica.

Observou-se também correlação positiva fraca entre os níveis séricos de triacilgliceróis e de HDLc (gráfico 9 B), diferente do que é comumente observado em humanos.

Em estudo anterior (ÁGUILA et al., 2002), observou-se forte influência do tipo de lipídio dietético sobre as concentrações de HDLc, em ratos. Nesse estudo, os autores encontraram níveis mais elevados de HDLc no grupo de animais alimentados com óleo de canola, fonte de AGMI. No presente estudo, no entanto, os diferentes tipos de lipídios oferecidos aos animais dos grupos controle, TAGC₇ 30%, TAGC₇ 50% e controle dois, não exerceram grande influência sobre os níveis séricos de HDLc. A ausência de fontes de AGMI pode ter contribuído com os resultados encontrados.

Há fortes evidências de que a substituição de TCL por TCM na dieta influencia os níveis séricos de triacilgliceróis de jejum. Gilani et al. (2002) observaram níveis de triacilgliceróis significativamente superiores em ratos alimentados com TCM, quando comparados àqueles alimentados com TCL. Efeito semelhante foi observado por Hill et al. (1990), em humanos. No primeiro estudo, os TCM da dieta eram compostos principalmente por 12:0 e 14:0 enquanto que, no segundo, por 8:0 e 10:0. Conforme pode ser observado na tabela 1 (p. 55), os níveis séricos de triacilgliceróis dos animais que sofreram substituição parcial do óleo de soja da dieta pelo óleo experimental, fonte de AGCM, não diferiram significativamente daqueles apresentados pelos demais.

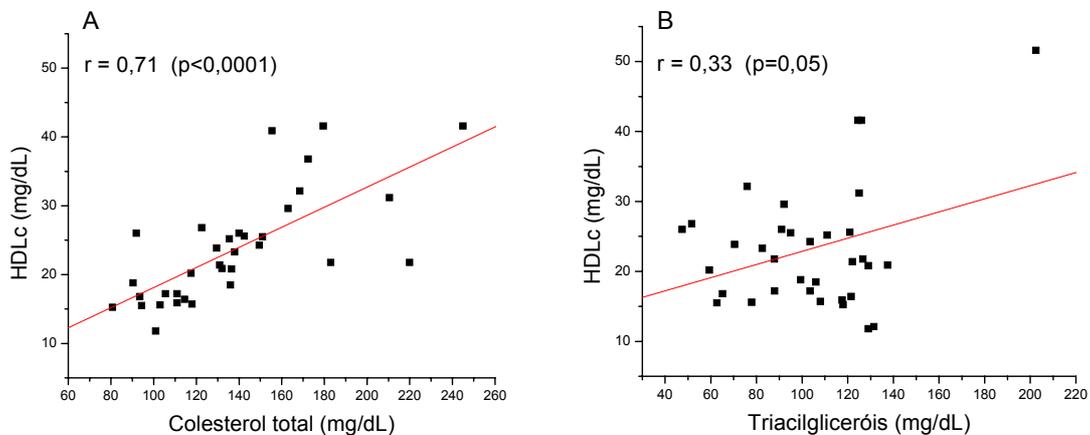


Gráfico 9 – Correlações entre os níveis séricos de colesterol total e HDLc (**A**) e de triacilgliceróis e HDLc (**B**), no conjunto dos animais dos grupos controle, TAGC₇ 30%, TAGC₇ 50% e controle dois.

Alguns fatores podem ter contribuído para o estabelecimento das diferenças observadas entre os estudos. Um deles é o nível de substituição das fontes dietéticas de TCL pelas de TCM. Enquanto que nos outros dois estudos a substituição foi de 75% e 100%, respectivamente, aqui a substituição foi de 30% e 50%, para as dietas TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50% (suplementadas com AGPI), respectivamente. Os níveis de substituição aqui adotados, empregados freqüentemente na prática clínica, podem não ter sido grandes o suficiente para promover o efeito observado nos outros casos.

Um outro fator seria o padrão em AGCM das dietas ricas em TCM. Não há estudo anterior sobre o consumo prolongado do ácido enântico em ratos que possa servir de comparação. Por outro lado, as dietas utilizadas nos outros dois trabalhos não apresentavam ácido enântico em suas composições, por isso, as alterações observadas nos níveis séricos de triacilgliceróis não podem ser atribuídas a ele.

O aporte calórico total das dietas e os percentuais das calorias fornecidos como lipídios, também devem ser considerados. No trabalho de Gilani et al. (2002), os animais foram alimentados com dietas contendo 5%, 10% e 20% das calorias totais como lipídios. Os autores não observaram efeito do nível de lipídios sobre os triacilgliceróis séricos. No trabalho de Hill et al. (1990), por sua vez, os lipídios forneceram 40% das calorias totais das dietas, que apresentavam um excesso de 50% das necessidades de energia dos indivíduos pesquisados. Os autores atribuíram a

elevação dos níveis séricos de triacilgliceróis ao aumento induzido pelos TCM da velocidade de síntese *de novo* de ácidos graxos, bem como do alongamento e da dessaturação da cadeia, especialmente em dietas hipercalóricas. A análise do perfil de ácidos graxos dos triacilgliceróis de jejum permitiu tal conclusão.

As dietas controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50% não apresentavam excesso calórico ou aporte lipídico superior ao preconizado para a espécie animal. Isso pode ter contribuído de forma decisiva para a ausência de diferenças significativas entre os níveis séricos de triacilgliceróis de jejum dos animais. Resultado semelhante foi encontrado por Chanez et al. (1991), com dietas isocalóricas, com 32% de suas calorias na forma de TCM ou TCL.

3.4.4 Outros parâmetros bioquímicos

Foram determinados, ainda, os níveis séricos de glicose e ferro total para avaliação do estado nutricional dos animais, além do estudo da influência da substituição parcial do óleo de soja da dieta pelo óleo experimental, sobre tais parâmetros bioquímicos.

Embora tenha havido diferenças significativas entre os níveis séricos de glicose do grupo TAGC₇ 50% e controle dois (tabela 1, p. 55), todos os grupos apresentaram glicemia dentro dos padrões de referência para a espécie, de 50 a 135 mg/dL (MITRUKA; RAWNSLEY, 1977). Ringler e Dabich (1979) esclarecem, ainda, que a glicose sanguínea de jejum no rato tende a ser maior que os níveis observados em humanos normais.

Surpreendentemente, os animais do grupo controle dois apresentaram glicemia inferior àquela observada no grupo TAGC₇ 50%. Não houve diferenças significativas entre os grupos controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50%.

Em estudos anteriores, Chanez et al. (1991) e Águila et al. (2002) observaram que o tipo de lipídio da dieta, TCM ou TCL, não exercia influência sobre a glicemia, em ratos. Neste último estudo, os autores concluíram que as alterações encontradas resultavam, provavelmente, do ganho de peso corporal dos animais.

No intuito de estabelecer uma causa provável para as diferenças na glicemia de jejum aqui observadas, foram realizadas análises de correlação entre glicemia e peso corporal, graus de esteatose hepática e relação peso do fígado/peso corporal (gráfico 10 A, B e C, respectivamente), no conjunto dos animais de todos os grupos estudados. Alterações nos valores glicêmicos são encontradas freqüentemente em indivíduos ou modelos animais com excesso de peso e/ou fígado gorduroso (AKIYAMA et al., 1996; UENO et al., 1997; SCHEEN; LUYCKX, 2002).

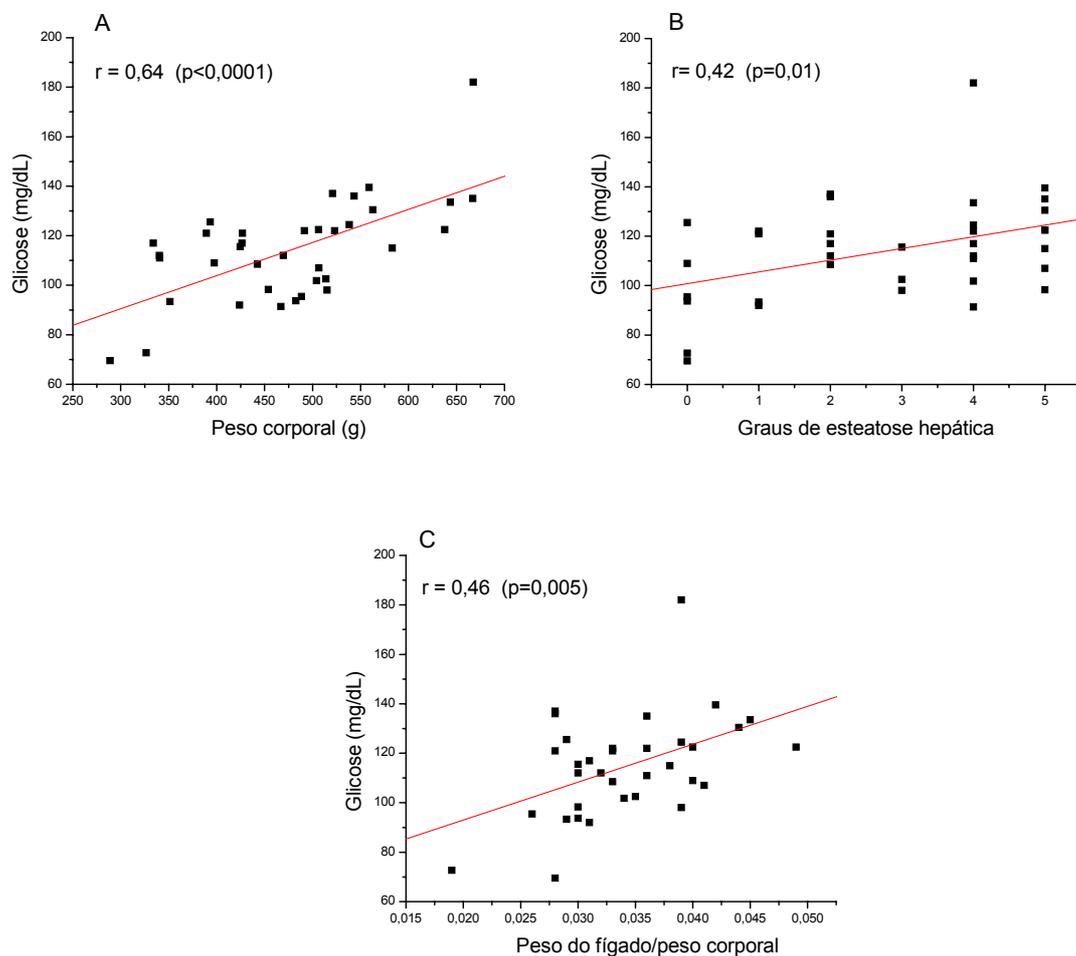


Gráfico 10 – Correlações entre níveis séricos de glicose e peso corporal (A), graus de esteatose hepática (B) e relação peso do fígado/peso corporal (C), no conjunto dos animais dos grupos controle, TAGC₇ 30%, TAGC₇ 50% e controle dois.

Em todos os casos foram observadas correlações positivas altamente significativas, sugerindo que a glicemia de jejum sofreu influência do ganho de peso corporal e do quadro de esteatose hepática. Dada a ausência de diferença significativa entre os animais dos grupos controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50%, apesar da diferença entre os grupos controle dois e TAGC₇ 50%, de causa não esclarecida, pode-se concluir que, nas condições aqui adotadas, a substituição parcial do óleo de soja pelo óleo experimental, não produziu efeito sobre os níveis séricos de glicose de jejum, em ratos.

Não foram observadas diferenças significativas entre os níveis séricos de ferro total apresentados pelos animais de todos os grupos estudados (tabela 1, p. 55). Alterações dos níveis séricos podem ser observadas na carência alimentar, no consumo concomitante de agentes depressores da absorção do ferro dietético (fitatos, fosfatos, oxalatos), nas síndromes de má absorção, na acloridria gástrica e nos quadros hemorrágicos, dentre outros (BORGES et al., 2000).

As dietas controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50% foram elaboradas com a mesma fonte e quantidade total de ferro (citrato férrico – 16,5% de ferro; 6g/Kg da mistura mineral). A ração comercial, fornecida aos animais do grupo controle dois, foi enriquecida com ferro (1,8g/Kg de dieta), de fonte não declarada. A ração comercial apresentava, ainda, farelos de soja ou de cereais, ricos em substâncias inibidoras da absorção do ferro.

Apesar do exposto, nenhuma dieta promoveu alterações nos níveis séricos de ferro. Tampouco deve ter havido prejuízo da absorção intestinal desse mineral ou perdas excessivas em qualquer dos grupos estudados. Por tais razões, pode-se considerar que o óleo experimental, nas condições aqui adotadas, também não induziu alterações nos níveis séricos de ferro.

3.5 Análise histológica do fígado

Um achado histológico importante apresentado pelos animais dos grupos controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50%, cuja discussão teve início no item 3.4.1, foi a esteatose hepática (figura 4).

A doença do fígado gorduroso constitui um espectro de doenças que vai desde a esteatose e esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) até cirrose e falência hepática (SCHEEN; LUYCKX, 2002).

A esteatose caracteriza-se histologicamente pelo acúmulo de lipídios no citoplasma dos hepatócitos, especialmente triacilgliceróis, com conseqüente aumento do peso do fígado. Biopsia hepática, ultrassonografia e tomografia computadorizada são ferramentas úteis no diagnóstico do fígado gorduroso. Quando o conteúdo de gordura no fígado excede 10% do peso do órgão, começa a aparecer em muitos hepatócitos. Quando excede 30%, quase todos os hepatócitos apresentam uma gota grande de gordura. A gravidade da lesão geralmente é traduzida pelo grau de comprometimento do ácino de Rappaport: a) leve, para o terço perivenular; b) moderada, para dois terços do ácino; e, c) severa, para o ácino inteiro (UENO et al., 1997). No método de coloração hematoxilina-eosina há perda de gordura e o que se observa é um espaço vazio.

A depender do padrão de acúmulo de lipídios é subdividida em esteatose macrovesicular e microvesicular. Na esteatose macrovesicular, padrão encontrado nos animais deste estudo, observam-se vacúolos citoplasmáticos únicos que deslocam o núcleo da célula para a periferia. O acúmulo crescente de lipídios pode promover ruptura e coalescência de células tumefeitas adjacentes, com conseqüente formação de um grande vacúolo (pseudocisto) (figura 4 G). Na esteatose microvesicular, observa-se acúmulo intracitoplasmático de pequenos vacúolos de lipídios, que não deslocam o núcleo da sua posição central (GAYOTTO; VIANNA; LEITÃO, 2001).

Os mecanismos fisiopatológicos das duas formas de expressão morfológica da esteatose hepática são diferentes. No primeiro caso, o mecanismo básico está relacionado ao aumento do fluxo de ácidos graxos livres (AGL) para o fígado e redução da mobilização de gorduras a partir dele. No segundo, ocorre diminuição da β -oxidação mitocondrial dos ácidos graxos, gerando um distúrbio maior no metabolismo oxidativo da célula. Neste caso, expressão da forma aguda da esteatose, o prognóstico é mais grave, podendo levar à insuficiência hepática e ao óbito (GAYOTTO; VIANNA; LEITÃO, 2001).

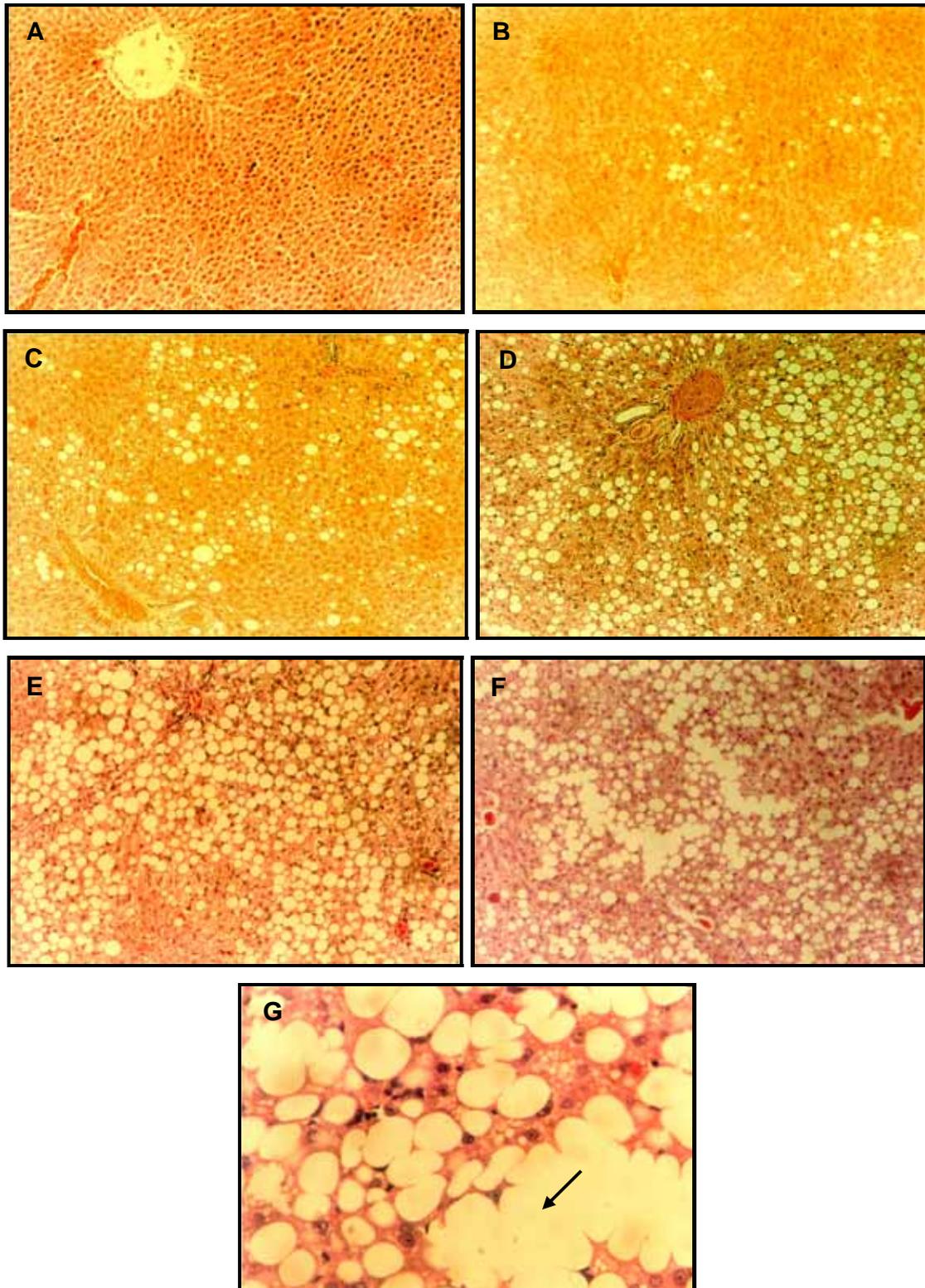


Figura 4 – Cortes histológicos do fígado corados pelo método HE. Esteatose hepática graus 0 (fígado normal), 1, 2, 3, 4 e 5, em **A**, **B**, **C**, **D**, **E** e **F**, respectivamente (10 x). Esteatose hepática grau 5 em **G** com pseudocistos (seta) (40 x).

A maioria dos indivíduos com doença do fígado gorduroso não alcoólica é assintomática. A anormalidade mais comum nos marcadores de lesão hepática é a elevação de duas a três vezes dos níveis séricos de ALT e AST. A relação AST/ALT geralmente é menor que 1. Quando a relação é maior que 1, presume-se avanço da doença. Doenças hepáticas com $AST/ALT < 1$ são freqüentemente relacionadas à obesidade, à falta de exercícios físicos e à hiperlipidemia. Relações $AST/ALT > 1$, por sua vez, ao consumo de álcool e ao *diabetes mellitus* (SCHEEN; LUYCKX, 2002).

Está se tornando cada vez mais evidente que a esteatose hepática não é essencialmente uma entidade puramente benigna, de bom prognóstico. O fígado gorduroso é mais vulnerável a agentes oxidantes, aumentando o risco de desenvolvimento de esteato-hepatite e a progressão para fibrose e cirrose (KOTEISH; DIEHL, 2002; DAY, 2002).

Vários modelos experimentais têm sido utilizados para elucidar os mecanismos envolvidos na gênese da esteatose hepática e esteato-hepatite. Camundongos geneticamente obesos e diabéticos (*ob/ob*), camundongos lipoatróficos diabéticos e ratos ou camundongos normais alimentados com dietas deficientes em colina e metionina são alguns deles.

Camundongos *ob/ob* representam um modelo de ocorrência natural da doença do fígado gorduroso não alcoólica. Eles são deficientes em leptina, um hormônio da saciedade sintetizado pelo tecido adiposo branco, que inibe o apetite e aumenta o gasto de energia, pela ação sobre os neurônios anorexígenos no núcleo mediano ventral do hipotálamo. Além disso, são resistentes à insulina e hiperinsulinêmicos, com resultante hiperglicemia e hiperlipidemia. Tais camundongos desenvolvem esteatose hepática espontaneamente (KOTEISH; DIEHL, 2002; DAY, 2002).

Os camundongos lipoatróficos diabéticos, geneticamente alterados, apresentam destruição dos adipócitos, com conseqüente lipoatrofia generalizada. Eles desenvolvem resistência à insulina, hiperinsulinemia, esteatose hepática e deficiência de leptina. Todos os modelos experimentais deficientes ou resistentes à leptina apresentam obesidade, dislipidemia, resistência à insulina, aumento do fator alfa de necrose tumoral ($TNF\alpha$) e doença do fígado gorduroso (KOTEISH; DIEHL, 2002; DAY, 2002).

E, o modelo experimental representado por ratos e camundongos alimentados com dietas deficientes em colina e metionina, severamente exauridos de antioxidantes hepáticos, como o GSH e a S-adenosilmetionina. Tais animais são mais vulneráveis ao estresse oxidativo, uma situação que induz à síntese de $TNF\alpha$ e outras citocinas pró-inflamatórias. Agentes oxidantes e o $TNF\alpha$ ativam a enzima IKK β (inibidor Kappa beta quinase) nos adipócitos e hepatócitos, levando à resistência à insulina e à doença do fígado gorduroso não alcoólica (KOTEISH; DIEHL, 2002; DAY, 2002).

A contribuição desses modelos experimentais para a compreensão dos complexos mecanismos envolvidos na gênese e evolução da doença do fígado gorduroso não alcoólica, via estresse oxidativo, é inestimável. O esquema da figura 5 apresenta um resumo desses mecanismos.

Day e James (1998) formularam a hipótese de que a patogênese da EHNA é multifatorial. O primeiro evento seria a instalação da esteatose hepática. Esta, por sua vez, sensibilizaria o fígado tornando-o vulnerável a uma variedade de insultos que culminariam com necroinflamação e fibrose. Segundo esses autores, a peroxidação lipídica e a formação de espécies reativas de oxigênio são fortes candidatas ao papel central na patogênese da EHNA. Os produtos finais da peroxidação lipídica, 4-hidroxinonenal e malondialdeído, estão implicados em reações metabólicas complexas que envolvem ligação com proteínas hepáticas e o comprometimento da resposta imune. Além disso, respondem pela formação dos corpúsculos de Mallory, filamentos intermediários (citoceratina) associados a outras proteínas do citoesqueleto, uma entidade histológica presente nos quadros de esteato-hepatite.

O influxo aumentado de ácidos graxos livres no fígado associado a potenciais alterações no metabolismo hepático, síntese aumentada e secreção diminuída de triacilgliceróis ou prejuízo na oxidação de ácidos graxos podem resultar em esteatose hepática (SCHEEN; LUYCKX, 2002).

A obesidade é a condição mais freqüentemente associada com a doença do fígado gorduroso não alcoólica, inclusive em crianças e adolescentes. Em função do aumento do número de casos de obesidade ao redor do mundo, a incidência de esteatose hepática também tem aumentado (UENO et al., 1997).

O fluxo aumentado de ácidos graxos do tecido adiposo para o fígado desempenha um papel importante na patogênese do fígado gorduroso nos indivíduos obesos (NAKAO et al., 2002). Tais indivíduos, principalmente aqueles com distribuição de gordura do tipo visceral (andróide), freqüentemente apresentam características associadas à doença do fígado gorduroso não alcoólica, como resistência à insulina e hiperinsulinemia, *diabetes* tipo 2, hiperleptinemia, superexpressão de TNF α no tecido adiposo e, possivelmente, aumento de endotoxinas derivadas do intestino. Por esta razão, a obesidade visceral é considerada fator de risco não somente para esteatose hepática, como também para hiperinsulinemia e resistência à insulina (SCHEEN; LUYCKX, 2002).

De fato, observa-se alta prevalência de fígado gorduroso em pacientes com a síndrome metabólica, caracterizada por resistência à insulina, hiperlipidemia, hipertensão e gordura visceral (NAKAO et al., 2002). As células adiposas viscerais são mais vulneráveis à lipólise que as periféricas, pois apresentam maior número de receptores adrenérgicos, maior produção de resistina (hormônio anti-insulina) e/ou maior produção de cortisol. Os ácidos graxos livres provenientes das células adiposas centrais migram diretamente para o fígado, via veia portal (DAY, 2002). A lipólise visceral, portanto, é a fonte de ácidos graxos para o fígado nos estados de resistência à insulina e hiperinsulinemia, como no fígado gorduroso (SCHEEN; LUYCKX, 2002).

No entanto, Koteish e Diehl (2002) afirmam que a obesidade *per se* não causa doença do fígado gorduroso não alcoólica ou resistência à insulina. A patogênese dessas duas entidades estaria, segundo os autores, fortemente relacionada às seqüelas metabólicas e imunológicas da deficiência ou resistência à leptina. Tais seqüelas contribuiriam com o acúmulo de gordura no fígado, através da promoção da resistência à insulina ou da modulação da sua sinalização nos hepatócitos (NAKAO et al., 2002).

Por outro lado, estudos com humanos e animais têm mostrado associação entre resistência à insulina induzida por obesidade e doença do fígado gorduroso não alcoólica (AKIYAMA et al., 1996; DAY, 2002; SCHEEN; LUYCKX, 2002), ilustrada na figura 5.

Embora a obesidade tenha um importante componente genético na sua determinação, o consumo de dietas hipercalóricas ricas em carboidratos e/ou lipídios e o sedentarismo são fortes fatores predisponentes. Ademais, o aumento do consumo calórico é um fator importante para o desenvolvimento de obesidade até mesmo em animais geneticamente obesos. O alto nível de ingestão de gorduras e de alimentos processados, hábito alimentar ocidental que está se disseminando pelo mundo, é considerado o fator principal no desenvolvimento da obesidade e da resistência à insulina (AKIYAMA et al., 1996).

Por essa razão e pela aparente ausência de fatores outros que pudessem elucidar as causas que levaram ao quadro de esteatose hepática apresentado pelos animais dos grupos controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50%, é que foram estudadas as correlações entre graus de esteatose hepática ou relação peso do fígado/peso corporal com o peso corporal dos animais (gráfico 6 B e C, respectivamente, p. 59). Nos dois casos foram observadas correlações positivas altamente significativas, apesar da ausência de diferenças significativas entre os pesos corporais.

Além disso, a correlação entre relação peso do fígado/peso corporal e peso corporal dos animais fornece uma estimativa da distribuição de gordura. Uma vez que o peso do fígado em relação ao peso corporal total dos animais aumentou com o ganho de peso, pode-se desconfiar da participação do tipo de distribuição de gordura (visceral) na determinação da esteatose, via resistência à insulina, secundária ao aumento de peso. Ao sacrifício, foi observado grande volume de tecido gorduroso no abdome dos animais, especialmente nos maiores (figura 6). No entanto, a circunferência abdominal dos animais não foi medida e as dosagens de insulina ou os testes de resistência à mesma não foram realizados neste estudo.

Diferente dos estudos experimentais que objetivam desenvolver obesidade e doença do fígado gorduroso não alcoólica, as dietas aqui elaboradas não apresentavam modificação da sua composição e excesso calórico visando ganho de peso dos animais. A forma de oferta, *ad libitum* ao invés de infusão intragástrica, também dificultaria o ganho de peso, até mesmo com dietas manipuladas.

No entanto, o balanço energético que determina as variações ponderais é determinado pela relação entre o consumo e o gasto de energia. Nesse sentido,

observou-se que à medida que os animais cresciam, as gaiolas metabólicas iam limitando cada vez mais os seus movimentos. Como as mesmas eram cilíndricas, não havia a possibilidade de corrida, observada nas gaiolas retangulares de polipropileno, comumente usadas em biotérios. Os animais dos grupos controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50% movimentavam-se em sentido lateral, girando de um lado ao outro ou, em sentido vertical, ficando em pé na gaiola. Aqueles do grupo controle dois, no entanto, corriam livremente no espaço disponível da gaiola retangular. Tais diferenças no padrão de atividade física dos animais podem ter determinado as diferenças de peso corporal apresentadas no gráfico 7 (p. 60) as quais, apesar de não significativas, foram suficientes para demonstrar correlação com os graus de esteatose hepática.

O efeito benéfico da restrição calórica, exercícios físicos e redução gradual de peso sobre o controle da obesidade, *diabetes* tipo 2 e doença do fígado gorduroso não alcoólica, tem sido comprovado em estudos com humanos e animais (AKIYAMA et al., 1996; KOTEISHI; DIEHL, 2002).

Achado interessante foi o fato do grupo TAGC₇ 50% apresentar menor número de casos graves que o grupo controle ($p < 0,05$). Esse fato, associado à presença de esteatose no grupo controle, descarta a possibilidade de efeito tóxico do óleo experimental sobre o fígado. Quadros de esteatose hepática macro ou microvesicular são observados nas lesões hepáticas induzidas por drogas (GAYOTTO; VIANNA, LEITÃO, 2001).

O maior efeito lipogênico dos AGCL, presentes em maior quantidade na dieta controle, quando comparados aos AGCM, especialmente presentes nas dietas experimentais, contribuindo para a maior deposição de gordura no tecido adiposo e conseqüente ganho de peso, pode ter concorrido para as diferenças observadas entre os grupos controle e TAGC₇ 50%. Ratos *Sprague-Dawley*, em crescimento, alimentados com dietas hipercalóricas contendo TCL, apresentaram maior número e tamanho de adipócitos que aqueles alimentados com TCM (HASHIM; TANTIBHEDYANGKUL, 1987). Estudos com ratos *Wistar* machos adultos também observaram aumento de ganho de peso com TCL contra TCM (CHANEZ et al., 1991). Gilani et al. (2002) encontraram menor teor de lipídios hepáticos em ratos *Sprague-Dawley* adultos alimentados com TCM, quando comparados com ratos alimentados com TCL.

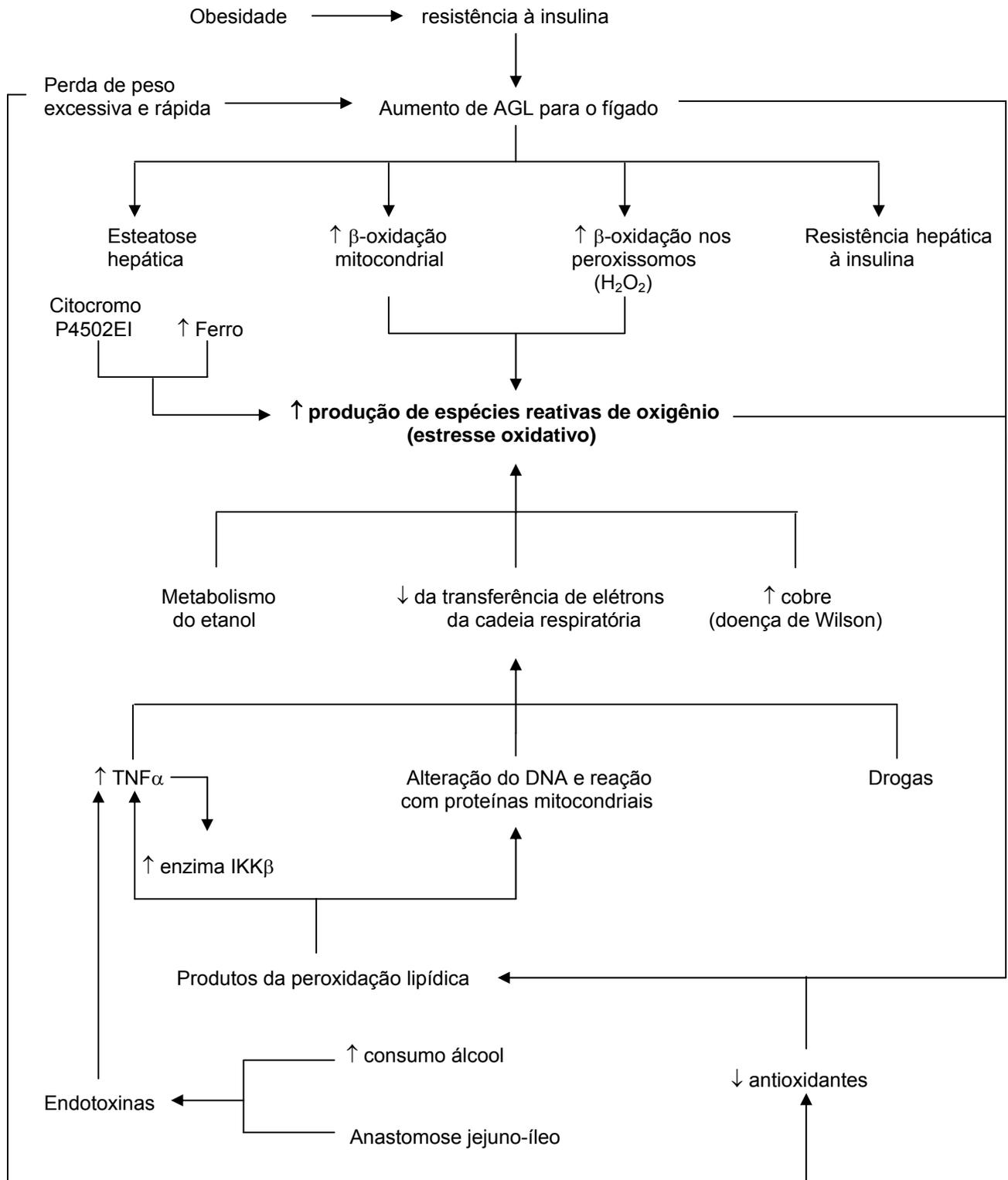


Figura 5 – Mecanismos envolvidos na gênese e evolução da doença do fígado gorduroso não alcoólica via estresse oxidativo. Dados retirados dos trabalhos de Day (2002) e Scheen e Luyckx (2002).

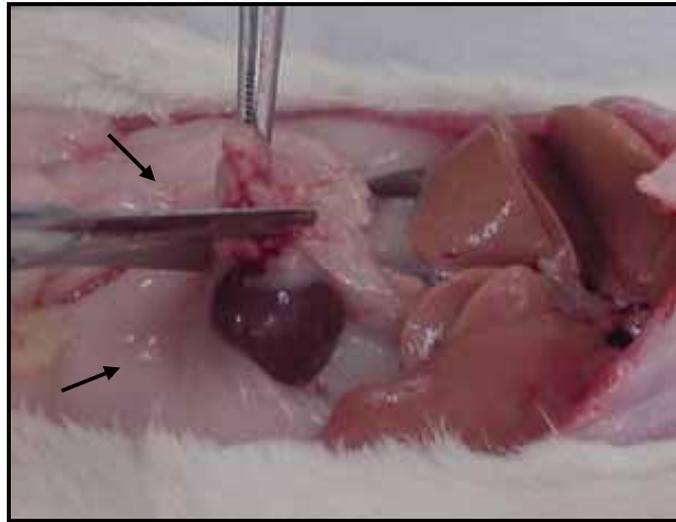


Figura 6 – Acúmulo de gordura abdominal (setas).

Em todos esses estudos citados anteriormente, o percentual de substituição do óleo convencional por TCM, a quantidade total de lipídios e o aporte calórico das dietas eram superiores aos encontrados nas dietas aqui elaboradas e na ração comercial Labina®. Isso, provavelmente, foi decisivo para a ausência de diferenças significativas entre os pesos corporais dos animais dos grupos controle, TAGC₇ 30%, TAGC₇ 50% e controle dois. Apenas no nível de substituição mais elevado (50%) é que foi possível observar algum efeito protetor do óleo experimental contra o acúmulo excessivo de gordura no tecido hepático.

Os gráficos 11 e 12 ilustram as diferenças do peso relativo do fígado e do teor de lipídios hepáticos totais entre os diversos grupos, respectivamente. Pode-se observar que o peso relativo do fígado dos animais do grupo TAGC₇ 50% não diferiu significativamente daquele encontrado no grupo controle dois, cuja morfologia hepática mostrou ausência de lesão gordurosa. Isso reforça o já discutido efeito protetor do óleo experimental.

Todos os grupos que apresentaram esteatose hepática, no entanto, tinham teores de lipídios totais no fígado superiores aos observados no grupo controle dois. A média encontrada neste último foi de 4,31%, muito abaixo das demais. Apesar de não significativas, as diferenças entre os grupos controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50% foram suficientes para determinar menor gravidade do quadro neste último.

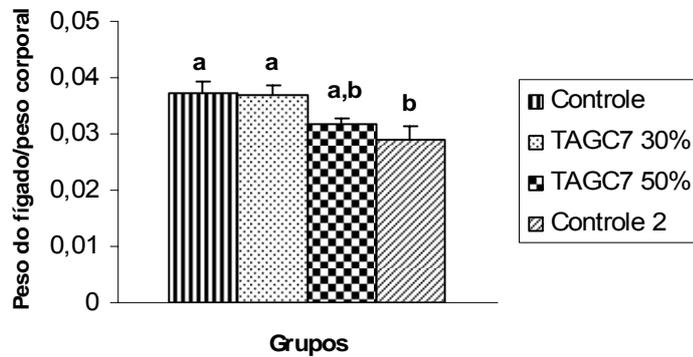


Gráfico 11 - Relação peso do fígado/peso corporal dos animais dos grupos controle, TAGC₇ 30%, TAGC₇ 50% e controle dois. [média ± s(m)]. **a** ≠ **b** ($p < 0,05$). Valores seguidos por pelo menos uma mesma letra, diferenças não significativas.

Uma vez que o peso relativo do fígado foi determinado através da pesagem do animal e do órgão, após jejum noturno que antecedeu o sacrifício, e o teor de lipídios hepáticos totais pela obtenção do extrato clorofórmico, procedeu-se o estudo de correlação entre tais variáveis para confirmação da influência do acúmulo lipídico sobre o peso final do órgão. O resultado, apresentado no gráfico 13, demonstra correlação positiva altamente significativa, o que assegura o valor das análises baseadas nessas variáveis.

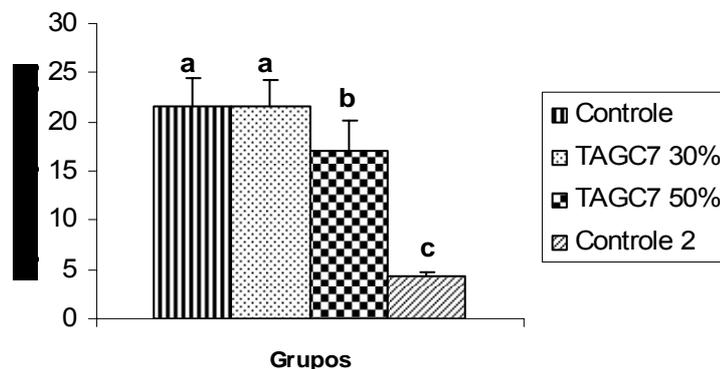


Gráfico 12 - Teor de lipídios hepáticos totais (% do peso do órgão) dos animais dos grupos controle, TAGC₇ 30%, TAGC₇ 50% e controle dois. **a** ≠ **c** ($p < 0,01$); **b** ≠ **c** ($p < 0,05$), **a** não difere de **b**.

Quanto às dosagens bioquímicas de interesse à questão ora abordada, apenas a relação $AST/ALT > 1$, parece destoar do quadro observado. Até mesmo a ausência de diferenças significativas entre os níveis séricos das enzimas hepáticas, observada na tabela 1 (p. 55), não era de todo inesperada mesmo considerando a presença de lesão gordurosa no fígado. Akiyama et al. (1996) não observaram diferenças significativas entre os níveis séricos de AST e ALT de ratos *Wistar* obesos com esteatose hepática (quadro induzido pela dieta) e de ratos normais.

As correlações entre graus de esteatose hepática e concentrações séricas de AST, ALT, FA e glicose, apresentadas nos gráficos 5 A e B, 8 A e 10 B, respectivamente (às p. 58, 62 e 84), foram positivas fracas significativas. Portanto, a gravidade do quadro de esteatose hepática, neste estudo, guardou relação direta com os níveis séricos de tais variáveis, como era de se esperar. No entanto, não foram observadas correlações com os níveis séricos de γ -GT, albumina e relação AST/ALT.

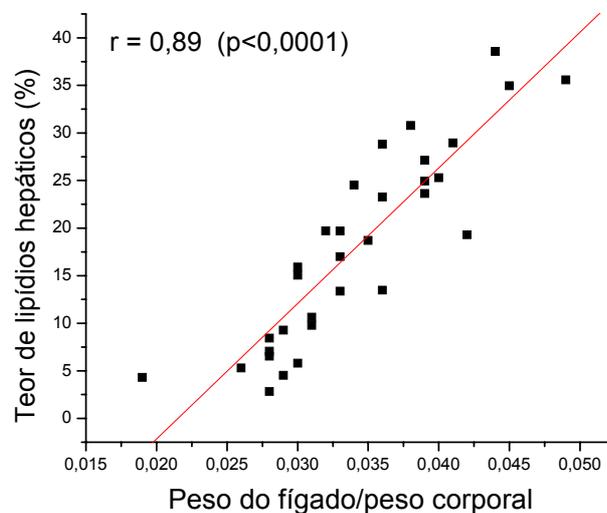


Gráfico 13 – Correlação entre relação peso do fígado/peso corporal e teor de lipídios hepáticos totais (% do peso do órgão), no conjunto dos animais dos grupos controle, TAGC₇ 30%, TAGC₇ 50% e controle dois.

O consumo de TCM em substituição aos TCL da dieta está freqüentemente associado à elevação dos níveis séricos de triacilgliceróis de jejum, provavelmente em

resposta ao aumento da síntese *de novo* de ácidos graxos. Como esse processo é dispendioso do ponto de vista energético, aos TCM é atribuída menor eficiência energética (HILL et al., 1990). Além disso, a presença de esteatose hepática nos animais dos grupos controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50%, provavelmente induzida pela restrição do gasto calórico e conseqüente aumento de peso corporal, torna surpreendente a ausência de dislipidemia nesses animais, em especial de elevação dos níveis de triacilgliceróis.

Apesar disso, pode-se suspeitar de algum grau de resistência à insulina nos animais com esteatose hepática, em resposta à restrição da atividade física e ao acúmulo de tecido adiposo visceral, com conseqüente aumento do fluxo de AGL para o fígado. Como os níveis séricos de insulina e AGL de jejum não foram determinados, tampouco foram realizados testes de resistência à insulina, esta hipótese carece de confirmação. Marchesini et al. (2001) concluíram que a doença do fígado gorduroso não alcoólica, na presença de normoglicemia e peso normal ou apenas moderadamente aumentado, apresenta características similares àquela encontrada no *diabetes* e na obesidade. De toda sorte, o que pode ser estabelecido, desde já, é que a lesão hepática gordurosa aqui observada não tem qualquer relação com o consumo do óleo experimental.

3.6 Análise histológica do rim

O único achado histológico interessante encontrado no rim de todos os animais estudados foi a presença de proteína na luz dos túbulos renais (figura 7 A). Este achado indica a presença de proteína na urina ou proteinúria.

Em humanos, a proteinúria, quase invariavelmente, acompanha uma lesão renal grave. No entanto, pode ser secundária a etiologias benignas ou extra-renais. A doença renal intrínseca está freqüentemente associada com proteinúria persistente, enquanto que a observada em etiologias extra-renais desaparecem rapidamente, quando a doença primária é tratada com êxito. A presença de pequenos graus de proteinúria, entretanto, é comumente observada (RAVEL, 1997).

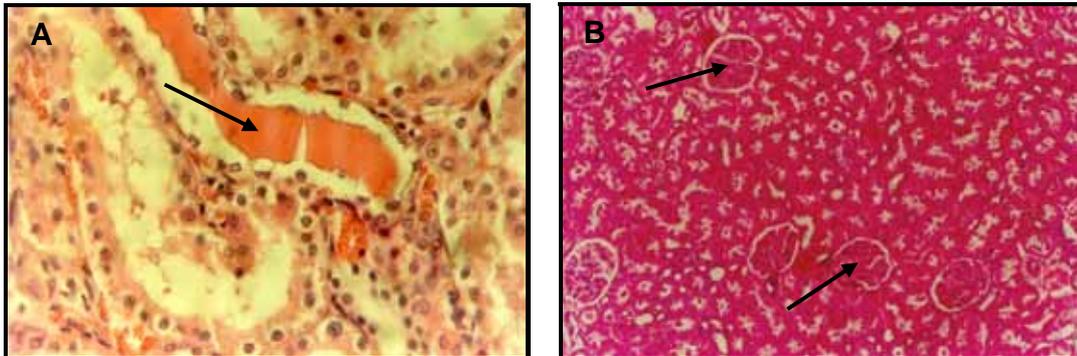


Figura 7 – Corte histológico do rim corado pelo método HE. Presença de material eosinofílico na luz do túbulo renal (seta) em **A** (40 x). Parênquima renal e glomérulos (setas) normais em **B** (10 x).

Ratos e camundongos, em contrapartida, apresentam proteinúria em condições normais (BIVIN; CRAWFORD; BREWER, 1979; PINHEIRO et al., 2003). Apesar de fisiológica, a proteinúria em ratos se agrava à medida que o animal envelhece. Isso ocasiona lesões renais relacionadas à idade dos animais, como a glomerulosclerose. Inicialmente observa-se lesão focal, tornando-se mais difusa com o decorrer do tempo (ANVER; COHEN, 1979).

O conteúdo protéico das dietas é um fator importante na incidência de doença renal crônica em ratos adultos. Além da glomerulosclerose, a nefrite crônica está associada com um alto consumo de proteína. Ratos alimentados com rações comerciais, cujo conteúdo protéico é mais elevado que aquele recomendado para a espécie na idade adulta (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), apresentam maior número de casos de nefrite crônica e menor expectativa de vida. Por estas razões, a longevidade desses animais é influenciada pela quantidade de proteína consumida, em especial na idade adulta, em função do potencial dano renal provocado por altas ingestões protéicas (ANVER; COHEN, 1979).

Apesar disso, a análise histológica do parênquima renal e dos glomérulos não indicou qualquer lesão no órgão, em nenhum dos grupos estudados (figura 7 B). Em idade mais avançada (os animais tinham 10 meses ao sacrifício), a probabilidade de encontrar lesões renais relacionadas à dieta, especialmente nos animais do grupo controle dois, seria maior, dada a quantidade elevada de proteína na ração comercial.

No entanto, nenhum achado histológico do tecido renal pode ser relacionado ao consumo do óleo experimental. Portanto, está descartada a possibilidade de efeito tóxico do mesmo ou de qualquer de seus metabólitos sobre a morfologia renal, nas condições empregadas neste estudo.

3.7 Análise histológica do intestino delgado

Foi realizada análise histológica dos diferentes segmentos do intestino delgado para avaliação do efeito do consumo crônico do óleo experimental sobre este órgão.

O intestino delgado é o local onde se completa a digestão dos alimentos e onde se dá o processo de absorção dos produtos da digestão. As células epiteliais que revestem o intestino delgado contêm dissacaridases, peptidases, fosfatase alcalina e pequenas quantidades de lipase entérica. A essas enzimas somam-se aquelas presentes no suco pancreático: amilase, tripsina, quimotripsina, carboxipeptidase, lipase pancreática, colesterol esterase e fosfolipase A₂. Os principais sítios de digestão e absorção no intestino delgado são o duodeno e a porção proximal do jejuno (GUYTON, 1997).

A presença de válvulas coniventes (pregas de Kerckring), vilosidades e microvilosidades aumenta a superfície da parede intestinal em, aproximadamente, 160 vezes. Esta é uma característica importante num órgão onde ocorre intenso processo absorptivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

As células mais comuns da mucosa do intestino delgado são os enterócitos ou células absorptivas, que surgem nas criptas e vão até o ápice das vilosidades. A superfície dessas células é recoberta por numerosos microvilos ricos em enzimas digestivas. Além dos enterócitos encontram-se as células caliciformes, células de Paneth, células enteroendócrinas e células M (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

No homem, a absorção da maior parte dos lipídios ocorre no duodeno e na porção superior do jejuno, enquanto que, no rato, a absorção máxima ocorre no jejuno. A absorção máxima da glicose no rato, por sua vez, acontece no jejuno e na porção proximal do íleo, e das proteínas não digeridas, nos segmentos distais do intestino delgado, através de pinocitose. Os aminoácidos, principalmente L-cistina, L-cisteína e

L-triptofano, têm sua absorção máxima no duodeno e no jejuno do animal (BIVIN; CRAWFORD; BREWER, 1979).

Diferente do que ocorreu com o tecido renal, foram observadas várias alterações histológicas no intestino delgado. Os animais apresentaram atrofia discreta ou hiperplasia das vilosidades, nos três segmentos do órgão. O padrão das alterações e a sua distribuição foram similares entre os grupos estudados (figura 8).

Além dessas alterações, pôde-se observar hiperplasia de folículos linfóides (figura 9 B), um caso de adenocarcinoma muco-secretor no duodeno e quatro alterações não específicas, também no duodeno (figura 10 A e B, respectivamente).

A frequência de vilosidades duodenais normais foi de 30% a 40% em todos os grupos estudados. O restante dos animais apresentou qualquer das alterações descritas anteriormente. O adenocarcinoma e duas das alterações não específicas foram observados no grupo controle. As outras duas alterações duodenais não específicas foram encontradas num animal do grupo TAGC₇ 30% e noutro do grupo TAGC₇ 50%.

O segmento jejunal foi o mais preservado. Na maioria dos grupos, 70% a 80% dos animais apresentaram vilosidades normais. A exceção ficou por conta do grupo TAGC₇ 30%, que apresentou distribuição de casos normais e alterados em igual proporção.

O número de casos normais *versus* alterados no íleo foi semelhante àquele observado no duodeno, com exceção do grupo controle dois. Este apresentou maior número de casos normais que os demais.

As alterações da mucosa intestinal, quando de origem extrínseca ou adquirida, podem advir de estados carenciais, infecciosos, medicamentosos ou tóxicos (CAMPOS; BARBIERI, 1974). Dentre os estados carenciais, a deficiência protéica é especialmente preocupante pelo prejuízo da síntese dos constituintes celulares e das enzimas digestivas, com repercussões sobre os processos metabólicos da célula, digestão dos alimentos e absorção dos nutrientes.

O quadro de atrofia das vilosidades intestinais é encontrado freqüentemente na enteropatia ambiental, uma síndrome de má absorção observada em crianças de baixo nível sócio-econômico, que convivem com elevada taxa de contaminação ambiental e

são submetidas à ingestão alimentar deficiente, ao desmame precoce, a surtos diarréicos de repetição ou à diarreia crônica. No marasmo, as vilosidades podem estar normais ou ligeiramente alteradas, enquanto que, no Kwashiorkor, tendem a se aplanar. A deficiência calórico-protéica está associada ao crescimento bacteriano de evolução crônica no intestino delgado, com conseqüente atrofia ou achatamento vilositário (COUTO, 1999).

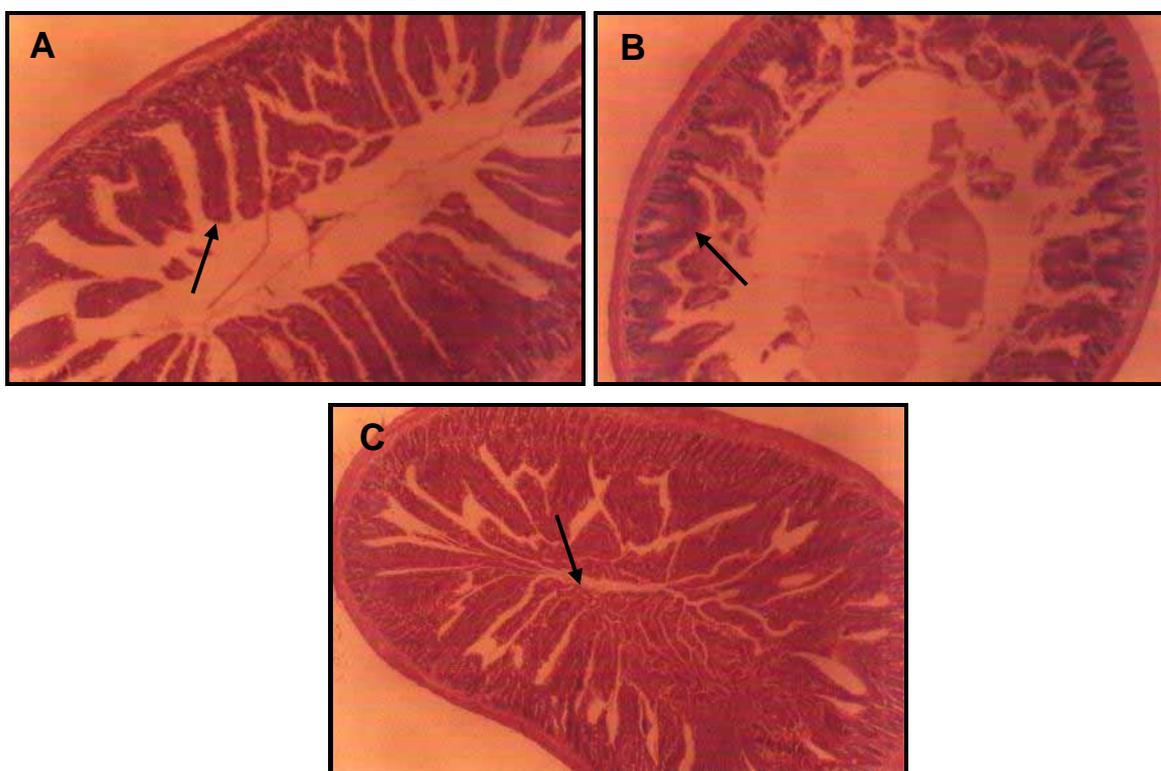


Figura 8 – Cortes histológicos do duodeno corados pelo método HE. Altura normal das vilosidades em animal do grupo TAGC₇ 30% (seta) (A), atrofia das vilosidades em animal do grupo TAGC₇ 50% (seta) (B) e hiperplasia das vilosidades em animal do grupo TAGC₇ 30% (seta) (C) (4 x).

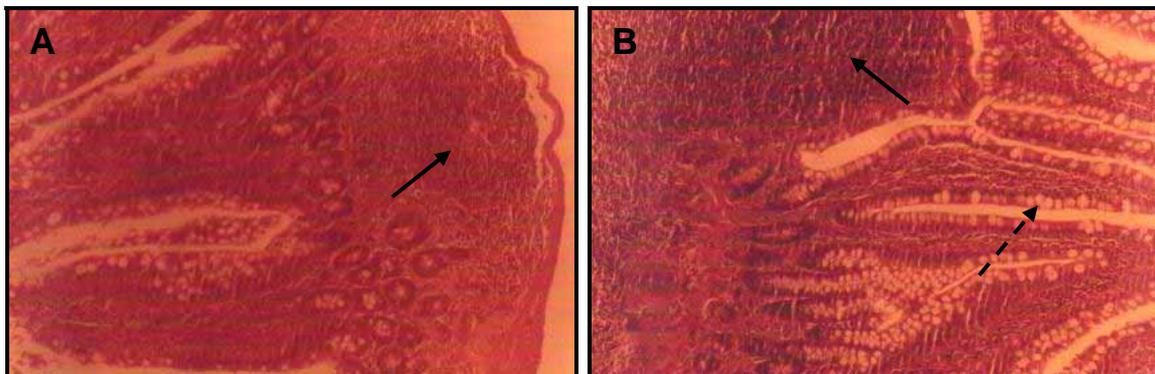


Figura 9 – Cortes histológicos do jejuno corados pelo método HE. Folículo linfóide (placa de Peyer) em animal do grupo controle (seta) (**A**), hiperplasia de folículo linfóide (seta contínua) e numerosas células caliciformes (seta tracejada) em animal do grupo TAGC₇ 50% (**B**) (10 x).

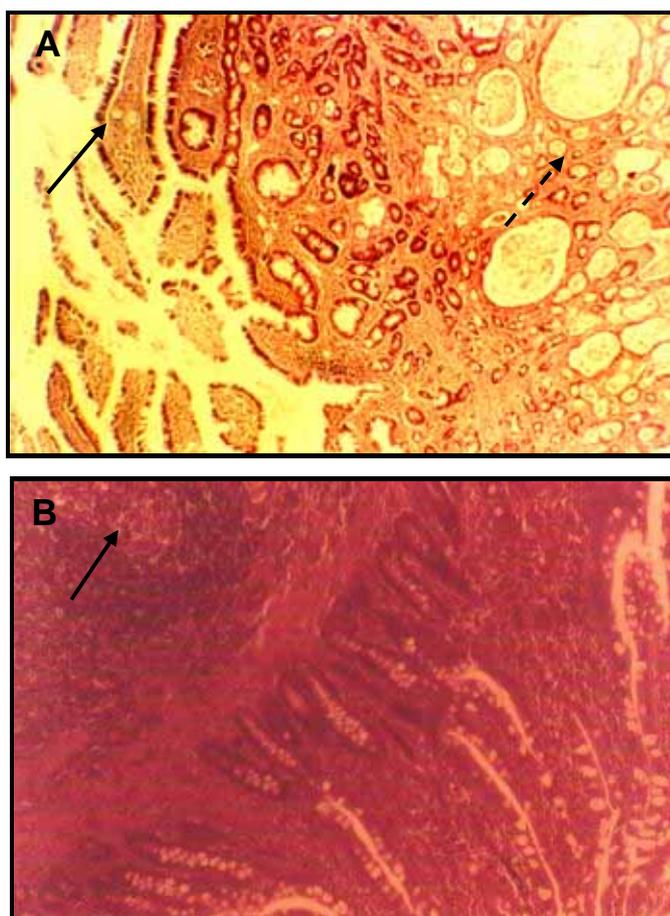


Figura 10 – Cortes histológicos do duodeno corados pelo método HE. Área normal (seta contínua) e adenocarcinoma (seta tracejada) em animal do grupo controle (**A**) e alteração inespecífica (seta) em animal do grupo TAGC₇ 30% (**B**) (10 x).

Doenças diarréicas inflamatórias do intestino também podem produzir alterações na mucosa. Dentre esse espectro de doenças incluem-se as enterocolites infecciosas, produzidas por agentes microbianos como bactérias, vírus, fungos, protozoários e helmintos, as enterocolites não infecciosas, provocadas por isquemia, irradiação, uremia, medicamentos citotóxicos e intoxicação por metais pesados ou, ainda, as enteropatias induzidas por reação alérgica, como na doença celíaca (ROBBINS; COTRAN; KUMAR, 1996).

Os linfonodos, por sua vez, podem responder de várias maneiras às infecções ou estados de estimulação imunitária. Os dois tipos principais de linfadenopatias reacionais são as linfadenites, em resposta à presença de um agente infeccioso no linfonodo, e as hiperplasias linfóides, em resposta à estimulação antigênica (SOARES; VASSOLO; PAES, 2000).

As alterações morfológicas apresentadas pelos animais deste estudo têm origem incerta. Embora não se possa descartar a presença de microrganismos patógenos no intestino delgado, os animais não apresentaram surtos diarréicos durante o experimento. As fezes mantiveram-se com aspecto normal desde a segunda semana de exposição às dietas controle e experimentais, após um período normal de adaptação. Além disso, os exames parasitológicos de fezes dos animais dos grupos controle, TAGC₇ 30% e TAGC₇ 50% realizados a cada dois meses, apresentaram resultado negativo. O mesmo pode ser deduzido em relação ao grupo controle dois, pois o biotério de origem dos animais também realizava exames de rotina para controle de parasitoses intestinais e monitoração das condições ambientais.

Uma consequência comum aos quadros de alteração da mucosa intestinal é o prejuízo dos processos digestivo-absortivos. No entanto, considerando-se os resultados obtidos na determinação dos coeficientes de eficiência protéica, de eficiência alimentar e de digestibilidade lipídica aparente, discutidos nos itens 3.2 e 3.3, respectivamente, pode-se deduzir que as alterações vilositárias aqui observadas não tiveram significado fisiológico importante. A preservação do segmento jejunal pode ter contribuído de forma decisiva para os resultados encontrados. Somando-se a isso o resultado obtido nas análises bioquímicas, percebe-se que não houve comprometimento do estado nutricional dos animais.

Outro achado interessante de ocorrência incomum foi o adenocarcinoma duodenal (figura 10 A). O epitélio do intestino delgado sofre renovação rápida conferindo uma notável capacidade de reparo a este órgão e uma maior vulnerabilidade aos agentes citotóxicos, que interferem com a reprodução celular. Apesar disso, tumores primários do intestino delgado são raros, tanto no homem quanto no rato (ALTMAN; GOODMAN, 1979; ROBBINS; COTRAN; KUMAR, 1996; WHITELEY et al., 1996).

No homem, os cânceres de intestino delgado são mais freqüentes que os tumores benignos; o segmento mais acometido é o íleo (ROBBINS; COTRAN; KUMAR, 1996). No rato, os tumores espontâneos ocorrem mais freqüentemente no intestino delgado e os quimicamente induzidos, no cólon (WHITELEY et al., 1996).

Apesar do observado, apenas um dos animais que apresentou alteração duodenal inespecífica (figura 10 B) teve perda gradual de peso, nas últimas semanas de experimento. De qualquer maneira, em função da distribuição dos diversos tipos de alterações encontradas no intestino delgado, em todos os grupos estudados, pode-se deduzir que o óleo experimental não promoveu nem agravou tais alterações. Contudo, as razões que levaram ao seu surgimento permanecem obscuras.

4 CONCLUSÕES

O consumo prolongado do óleo experimental, constituído por 64% de trienantina, 34% de dienantina e 2% de monoenantina, nos níveis de substituição do óleo de soja da dieta empregados neste trabalho, não comprometeu o crescimento, não determinou alterações no perfil bioquímico sérico e nem exerceu efeito tóxico sobre os tecidos hepático, renal e do intestino delgado, em ratos. Adicionalmente, exerceu efeito hepatoprotetor contra a esteatose.

Tais fatos permitem concluir pela ausência de efeito tóxico do óleo experimental, neste estudo, contribuindo para o estabelecimento do uso da trienantina na prática clínica.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁGUILA, M. B.; LOUREIRO, C. C.; PINHEIRO, A. da R.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Lipid Metabolism in Rats Fed Diets Containing Different Types of Lipids. **Arq. Bras. Cardiol.**, 78(1):32-38 (2002).

AKIYAMA, T.; TACHIBANA, I.; SHIROHARA, H.; WATANABE, N.; OTSUKI, M. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 31:27-35 (1996).

AKOH, C. C. Fat Replacers: Present and Future. In: Congresso e exposição latino-americano sobre processamento de óleos e gorduras, 1995, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, 1995.

ALTMAN, N. H.; GOODMAN, D. G. Neoplastic Diseases. In: BAKER, H. J.; LINDSEY, J. R. (Ed.). **The Laboratory Rat**. New York: Academic Press, 1979. v. I, p. 333-376.

AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION. Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. **J. Nutr.**, 107:1340-1348 (1977).

ANVER, M. R.; COHEN, B. J. Lesions Associated With Aging. In: BAKER, H. J.; LINDSEY, J. R. (Ed.). **The Laboratory Rat**. New York: Academic Press, 1979. v. I, p. 377-400.

ARAÚJO, R. S. Estudo Toxicológico das Drogas. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002. p. 166-183.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC: **Official methods of analysis**, 15. ed. By Williams, S., Arlington, VA, USA, 1990. p. 70, 79, 972-973.

ATAIDE, T. R. **Síntese de Tricaproína, Trienantina e Tricaprilina por vias Química e Enzimática**. 1999. 97 f. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas.

BABA, N.; BRACO, F. E.; HASHIM, S. A. Role of Brown Adipose Tissue in Termogénesis Induced by Overfeeding a Diet Containing Médium Chain Triglyceride. **Lipids**, 22(6):442-444 (1987).

BARBOSA, P. P. P.; LEMOS, A. L.; HOULY, R. S.; GOMES JÚNIOR, A.; FREITAS JÚNIOR, N.; FAÉ, J.; LEÃO, E.; PINHEIRO, T. Contribuição para o estudo de toxicidade da *Hyppis mutabilis Bric.* e do cariofileno: avaliação bioquímica e histopatológica. **Revista do Hospital Universitário, UFAL**, 5(1):42-46 (1998).

BIVIN, W. S.; CRAWFORD, M. P.; BREWER, N. R. Morphophysiology. In: BAKER, H. J.; LINDSEY, J. R. (Ed.). **The Laboratory Rat**. New York: Academic Press, 1979. v. I, p. 73-103.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A Rapid Method of Total Lipid Extration and Purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, 37:911-917 (1959).

BORGES, V. C.; FERRINI, M. T.; WAITZBERG, D. L.; OLIVEIRA, G. P. da C.; BOTTONI, A. Minerais. In: WAITZBERG, D. L. **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 117-150.

BRIGGS, G. B.; OEHME, F. W. Toxicology. In: BAKER, H. J.; LINDSEY, J. R. (Ed.). **The Laboratory Rat**. New York: Academic Press, 1979. v. I, p. 104-118.

CALORIE Control Council seeks improved petition process. Food Chemical News, 35(45):54-56 (1994) *apud* CÂNDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. Substitutos de gordura. In: _____. **Alimentos para fins especiais: dietéticos**. São Paulo: Varela, 1996. p. 259-330.

CÂMARA FILHO, J. E. D.; DE SOUZA, G. F. **Fígado: provas bioquímicas**. Disponível em: <http://www.bibliomed.com.br/bibliote/revistas/medica/vol08-n02/cap05.htm>. Acesso em: 2 mar. 2000.

CAMPOS, J. V. M.; BARBIERI, D. Defeitos da absorção intestinal e síndromes de má absorção. In: ALCÂNTARA, P.; MARCONDES, E. **Pediatria Básica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1974. 2. v., V. 2. p. 759-772.

CÂNDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. Substitutos de gordura. In: _____. **Alimentos para fins especiais: dietéticos**. São Paulo: Varela, 1996. p. 259-330.

CHANEZ, M.; BOIS-JOYEUX, B.; ARNAUD, M. J.; PERET, P. Metabolic Effects in Rats of a Diet With a Moderate Level of Medium-Chain Triglycerides. **J. Nutr.**, 121:585-594 (1991).

COLICHON Y., A.; TOREZAN FILHO, M.; STRAUSS, E. Métodos Diagnósticos: Provas de função hepática. In: GAYOTTO, L. C. da C.; ALVES, V. A. F. (ed.). **Doenças do Fígado e Vias Biliares**. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 139-419.

COLLEONE, V. V. Aplicações Clínicas dos Ácidos Graxos de Cadeia Média. In: CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a Gordura: os ácidos graxos**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2002. p. 439-454.

COSMETIC INGREDIENT REVIEW. Final Report on the Safety Assessment of Trilaurin, Triarachidin, Tribehenin, Tricaprin, Tricaprylin, Trierucin, Triheptanoin, Triheptylundecanoin, Triisononanoin, Triisopalmitin, Triisostearin, Trilinolein, Trimyrustin, Trioctanoin, Triolein, Tripalmitin, Tripalmitolein, Tririconolein, Tristearin, Triundecanoin, Glyceryl Triacetyl Hydroxystearate, Glyceryl Triacetyl Ricinoleate, and Glyceryl Stearate Diacetate. **Intern. Journal of Toxicol.**, 20(4):61-94 (2001).

COUTO, J. L. A. **Estudo Morfométrico da Mucosa Jejunal em Modelo Experimental de Esquistossomose Mansônica Associada a Dietas Normo ou Hipoprotéicas**. 1999. 102 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal Fluminense.

DAY, C. P. Pathogenesis of steatohepatitis. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. 16(5):663-678 (2002).

DAY, C. P.; JAMES, O. F. W. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? **Gastroenterology**, 114:842-845 (1998).

DEVLIN, T. M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. 4. ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 1998.

ERGAN, F.; TRANI, M.; ANDRÉ, G. Use of Lipases in Multiphasic Systems Solely Composed of Substrates. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 68(6):412-417 (1991).

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (FMUSP). **Laudo Clínico do Centro de Bioterismo**: exames bioquímicos de ratos *Wistar* adultos machos. Disponível em: http://www.tcirurgica.fm.usp.br/bioterio/wistar/machos_bioquimica.doc. Acesso em: 20 mai. 2003.

FAO/OMS/UNU. **Necesidades de energia y de proteínas**. Serie de Informes Técnicos 724 (OMS). Ginebra, 1985.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, 18(6):499-502 (1972).

FOMUSO, L. B.; AKOH, C. C. Enzymatic Modification of Triolein: incorporation of caproic and butyric acids to produce reduced-calorie structured lipids. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 74(3):269-272 (1997).

FOOD AND NUTRITION BOARD (FNB). **Recommended Dietary Allowances (RDA)**. 10. ed. Washington, DC: National Academic Press, 1989.

GAYOTTO, L. C. da C.; VIANNA, M. R.; LEITÃO, R. M. C. Fígado e Drogas. In: GAYOTTO, L. C. da C.; ALVES, V. A. F. (ed.). **Doenças do Fígado e Vias Biliares**. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 713-749.

GILANI, G. S.; RATNAYAKE, W. M. N.; BROOKS, S. P. J. BOTTING, H. G.; PLOUFFE, L. J.; LAMPI, B. J. Effects of dietary protein and fat on cholesterol and fat metabolism in rats. **Nutrition Research**. 22:297-311 (2002).

GRAZIOLA, F.; SOLIS, V. S.; CURI, R. Estrutura Química e Classificação dos Ácidos Graxos. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a Gordura**: os ácidos graxos. 1. ed. São Paulo: Manole, 2002. p. 5-24.

GREWAL, V. S.; RAMAMURTHI, S.; McCURDY, A. R. Synthesis and Properties of Erucic Acid Triacylglycerols. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 70(10):955-959 (1993).

GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

HASHIM, S. A.; TANTIBHEDYANGKUL, P. Medium Chain Triglyceride in Early Life: Effects on growth of adipose tissue. **Lipids**, 22(6):429-434 (1987).

HILL, J. O.; PETERS, J. C.; SWIFT, L. L.; YANG, D.; SHARP, T.; ABUMRAD, N.; GREENE, H. L. Changes in blood lipids during six days of overfeeding with medium or long chain triglycerides. **Journal of Lipid Research**, 31:407-416 (1990).

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. Sedimentation Concentration Method in Schistosomiasis mansoni. **Journal Publ. Health & Trop. Med.**, 9:283-298 (1934).

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

KIM, S. M.; RHEE, J. S. Production of Medium-Chain Glycerides by Immobilized Lipase in a solvent-Free System. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 68(7):499-503 (1991).

KOTEISH, A.; DIEHL, A. M. Animal models of steatohepatitis. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, 16(5):679-690 (2002).

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000.

LIMA, J. R.; NASSU, R. T. Substitutos de Gorduras em Alimentos: Características e aplicações. **Química Nova**, 19(2):127-134 (1996).

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 9. ed. São Paulo: Roca, 1998.

MARCHESINI, G.; BRIZI, M.; BIANCHI, G.; TOMASSETTI, S.; BUGIANESI, E.; LENSÍ, M.; MCCULLOUGH, A. J.; NATALE, S.; FORLANI, G.; MELCHIONDA, N. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: a feature of the metabolic syndrome. **Diabetes** (Journal of the American Diabetes Association), 50(8):1844-1850 (2001).

MAYES, P. A. Digestão e Absorção. In: MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper: bioquímica**. 8. ed. São Paulo: Atheneu, 1998. p. 635-647.

McNEILL, G. P.; SONNET, P. E. Low-Calorie Triglyceride Synthesis by Lipase-Catalyzed Esterification of Monoglycerides. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 72(11):1301-1307 (1995).

MILLER, O.; GONÇALVES, R. R. Bioquímica do Sangue: enzimas. In:____. **Laboratório para o Clínico**. 8. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 55-65.

MITRUKA, B. M.; RAWNSLEY, H. M. Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals. New York: Masson Publishing, 1977. *Apud*: FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (FMUSP). **Lauda Clínico**: resultado dos exames bioquímicos de ratos *Wistar* adultos machos. Disponível em: http://www.tcirurgica.fm.usp.br/bioterio/wistar/machos_bioquimica.doc. Acesso em: 20 mai. 2003.

MUNRO, I. C. Issues to be considered in the safety evaluation of fats substitutes. **Fd. Chem. Toxicol.**, 28(11):751-753, 1990.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A. RODWELL, V. W. **Harper**: Bioquímica. 9. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2002.

NAKAO, K.; NAKATA, K.; OHTSUBO, N.; MAEDA, M.; MORIUCHI, T.; ICHIKAWA, T.; HAMASAKI, K.; KATO, Y.; EGUCHI, K.; YUKAWA, K.; ISHII, N. Association Between Nonalcoholic Fatty Liver, Markers of Obesity, and Serum Leptin Level in Young Adults. **The American Journal of Gastroenterology**. 97(7):1796-1801 (2002).

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). **Dieta, Nutrición y prevención de enfermedades crónicas**. Serie de Informes Técnicos 797. Ginebra, 1990.

PINHEIRO, D. C. S. N.; FAVALI, C. B. F.; SOUZA FILHO, A. A.; DA SILVA, A. C. M.; FILGUEIRAS, T. M.; LIMA, M. da G. S. **Parâmetros Hematológicos de Camundongos e Ratos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará**. Disponível em: <http://www.cobea.org/artigo5.htm>. Acesso em: 27 nov. 2003.

RAUPP, D. S.; MOREIRA, S. S.; BANZZATO, D. A.; SGARBIERE, V. C. Composição e propriedades fisiológico-nutritivas de uma farinha rica em fibras insolúveis obtida do resíduo fibroso de fecularia de mandioca. **Ciência e Tecnologia alimentar**, V. 19, n. 2. Campinas, maio/ago., 1999.

RAVEL, R. **Laboratório Clínico**. Aplicações clínicas dos dados laboratoriais. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76 A Diet. **The Journal of Nutrition**, 127(5):838S-841S (1997).

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-93 rodent diet. **Journal of Nutrition**, 123:1939-1951 (1993).

RINGLER, D. H.; DABICH, L. Hematology and Clinical Biochemistry. In: BAKER, H. J.; LINDSEY, J. R. (Ed.). **The Laboratory Rat**. New York: Academic Press, 1979. v. I, p. 104 – 121.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

ROE, C. R.; SWEETMAN, L.; ROE, D. S.; DAVID, F.; BRUNENGRABER, H. Treatment of cardiomyopathy and rhabdomyolysis in long-chain fat oxidation disorders using an anaplerotic odd-chain triglyceride. **The Journal of Clinical Investigation**. 110(2):259-269 (2002).

SARTORELLI, D. S.; FRANCO, L. J. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional. **Cad. Saúde Pública**. 19(1):S29-S36 (2003).

SCHEEN, A. J.; LUYCKX, F. H. Obesity and liver disease. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism**. 16(4):703-716 (2002).

SELMI, B., GONTIER, E., ERGAN, F., BARBOTIN, J. N.; THOMAS, D. Lipase-Catalyzed Synthesis of Tricaprylin in a Medium Solely Composed of Substrates. Water Production and Elimination. **Enz. and Microb. Technol.**, 20:322-325 (1997).

SGARBIERI, V. C. **Alimentação e Nutrição**. Fator de saúde e desenvolvimento. Campinas: UNICAMP, 1987.

SOARES, F. A.; VASSOLO, J.; PAES, R. P. Sistema Hemolinfopoético. In: BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo. **Patologia**. 6a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. p. 709-761, 2000.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO (SBAN). **Cadernos de Nutrição**. Aplicações das Recomendações Nutricionais Adaptadas à População Brasileira. Ribeirão Preto, 1990. V. 2.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diretrizes de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 77, 2001. Suplemento III.

SOLOMONS, T. W. G. Carboxylic Acids and Their Derivatives. Nucleophilic Substitution at the Acyl Carbon. In: _____. **Organic Chemistry**. 6. ed. USA: John Wiley & Sons, Inc, 1996. p. 792-848.

STRYER, L. **Bioquímica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

TAGLE, M. A. **Nutrição**. São Paulo: Artes Médicas, 1981. p.49-66.

TRAU, K. A., DRIEDGER, A., INGLE, D. L.; NAKHASI, D. Toxicologic properties of medium-chain triglycerides. **Food and Chem. Toxicol.**, 38(1):79-98, (2000).

UENO, T.; SUGAWARA, H.; SUJAKU, K.; HASHIMOTO, O.; TSUJI, R.; TAMAKI, S.; TORIMURA, T.; INUZUKA, S.; SATA, M. TANIKAWA, K. Therapeutic effects of restricted diet and exercise in obese patients with fatty liver. **Journal of Hepatology**. 27:103-107 (1997).

VAN DER PADT, A., SEWALT, J. J. W.; VAN'T RIET, K. On-line Water Removal During Enzymatic Triacylglycerol Synthesis by Means of Pervaporation. **J. Memb. Sci.**, 80:199-208 (1993).

VANDERVEEN, J. E.; GLINSMANN, W. H. FAT SUBSTITUTES: A Regulatory Perspective. **Annu. Ver. Nutr.**, 12:437-487 (1992).

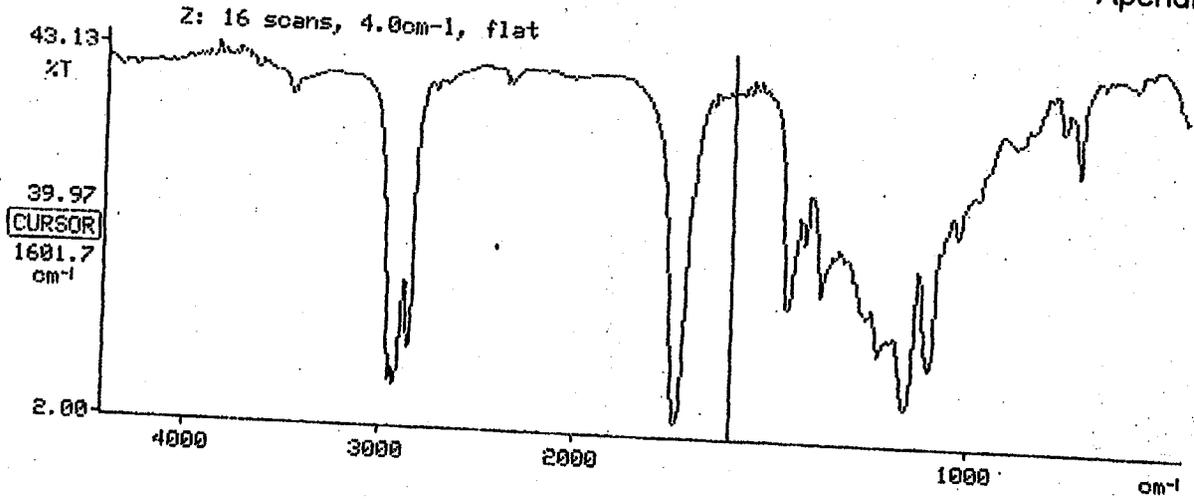
VOET, D.; VOET, J. **Biochemistry**. 2. ed. USA: Wiley Interscience, 1995.

WAITZBERG, D. L.; BORGES, V. C. Gorduras. In: WAITZBERG, D. L. **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 55-78.

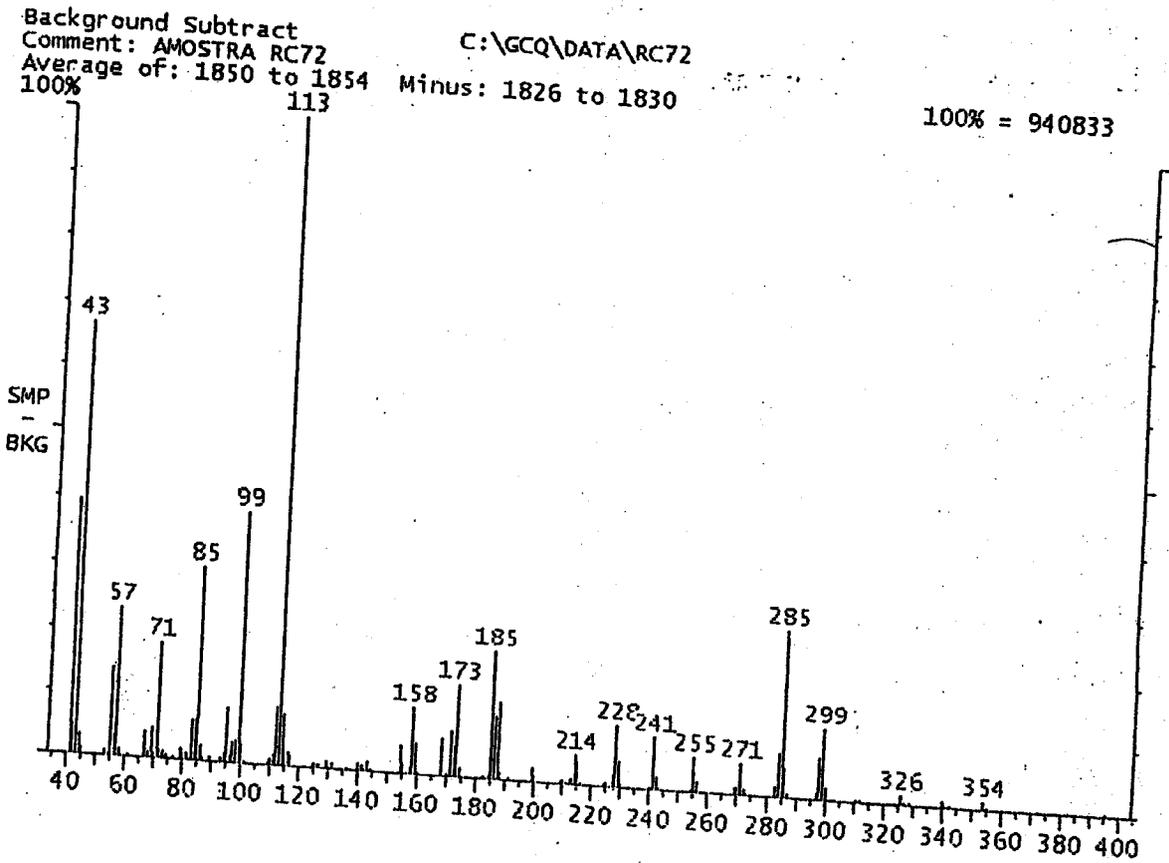
WHITELEY, L. O.; ANVER, M. R.; BOTTS, S.; JOKINEN, M. P. Proliferative Lesions of the Intestine, Salivary Glands, Oral Cavity, and Esophagus in Rats. **Guides for Toxicologic Pathology** of the Society of Toxicologic Pathologists. Washington, D.C., 1996.

6 APÊNDICES

Apêndice 1

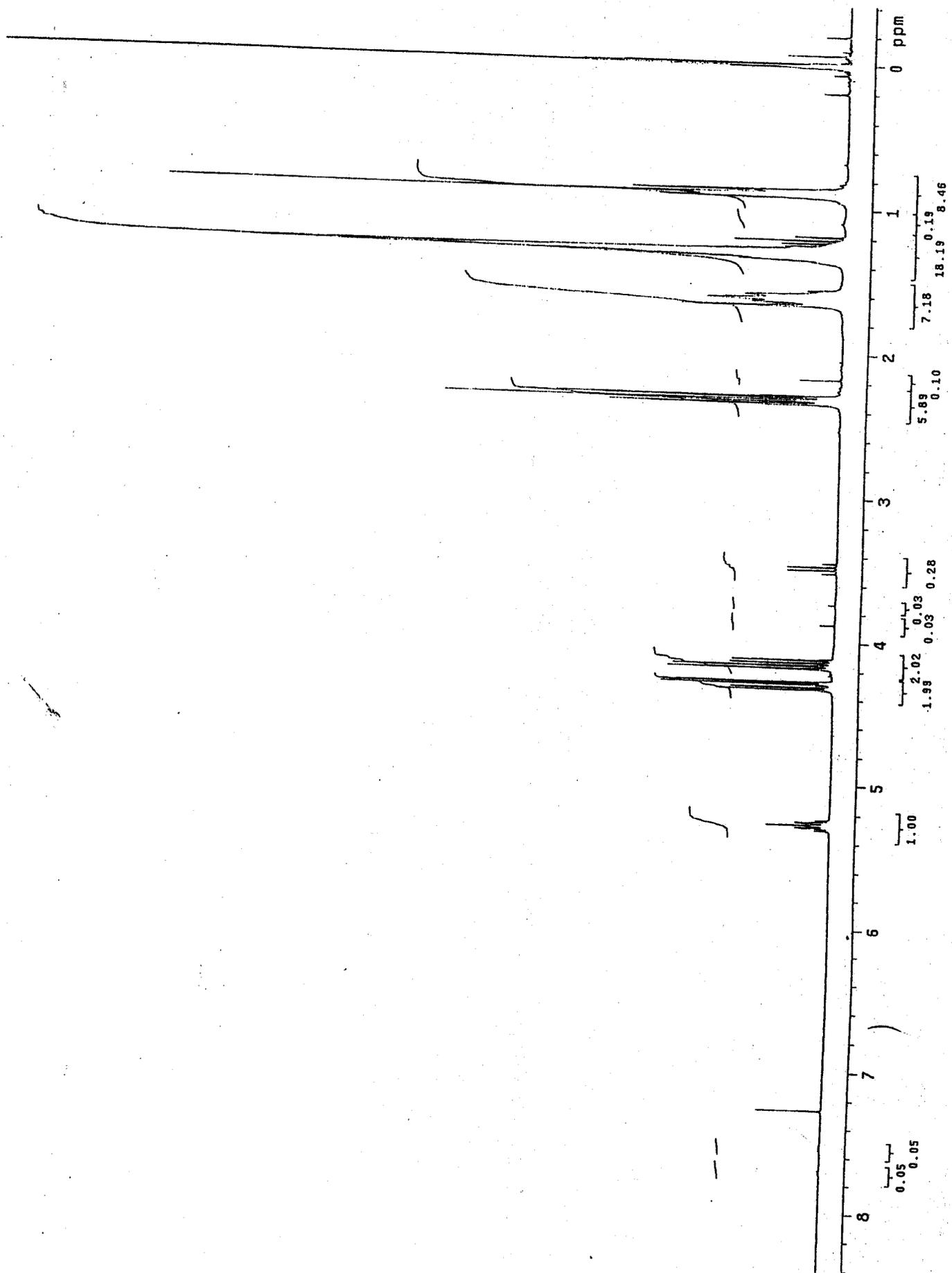


Espectro na região do Infravermelho (IVTF) da trienantina em pastilha de NaCl

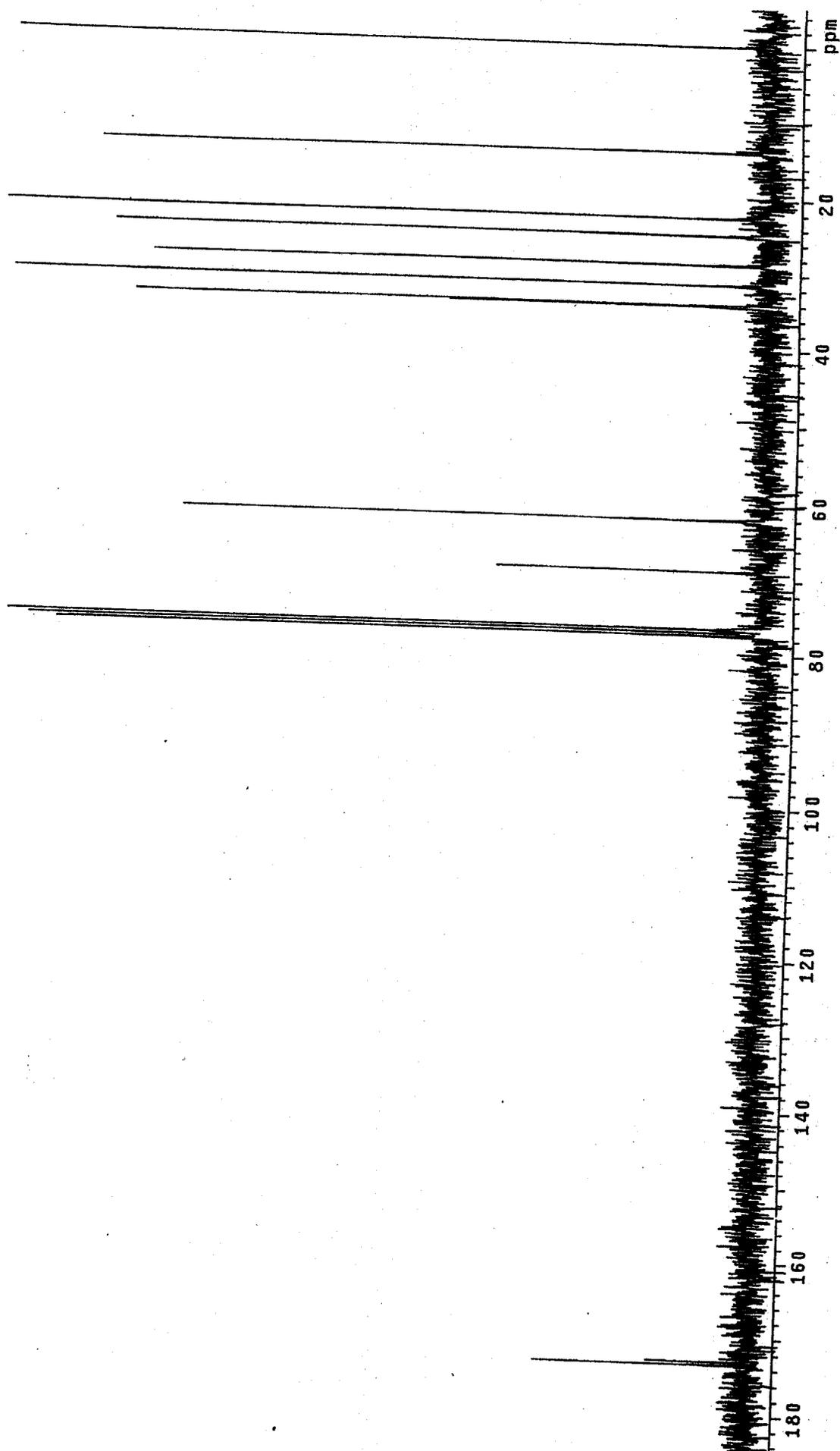


Espectro de massas da trienantina a 70 eV

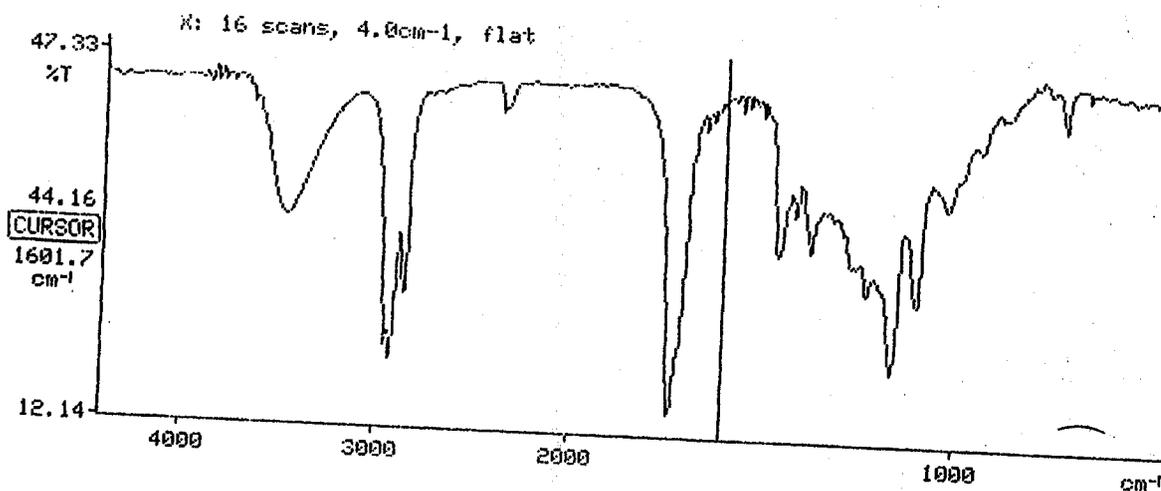
Apêndice 2



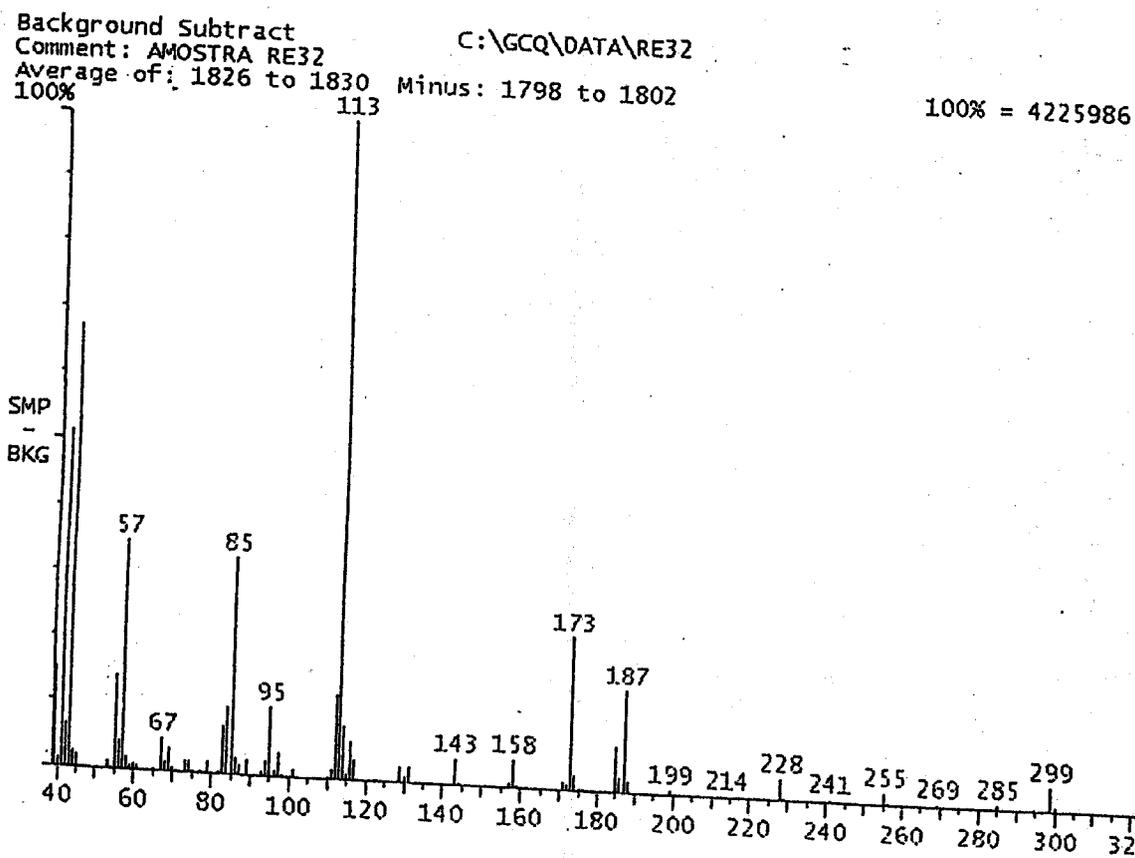
Apêndice 3

Espectro de RMN ^{13}C da triacontina em CDCl_3 a 100 MHz

Apêndice 4

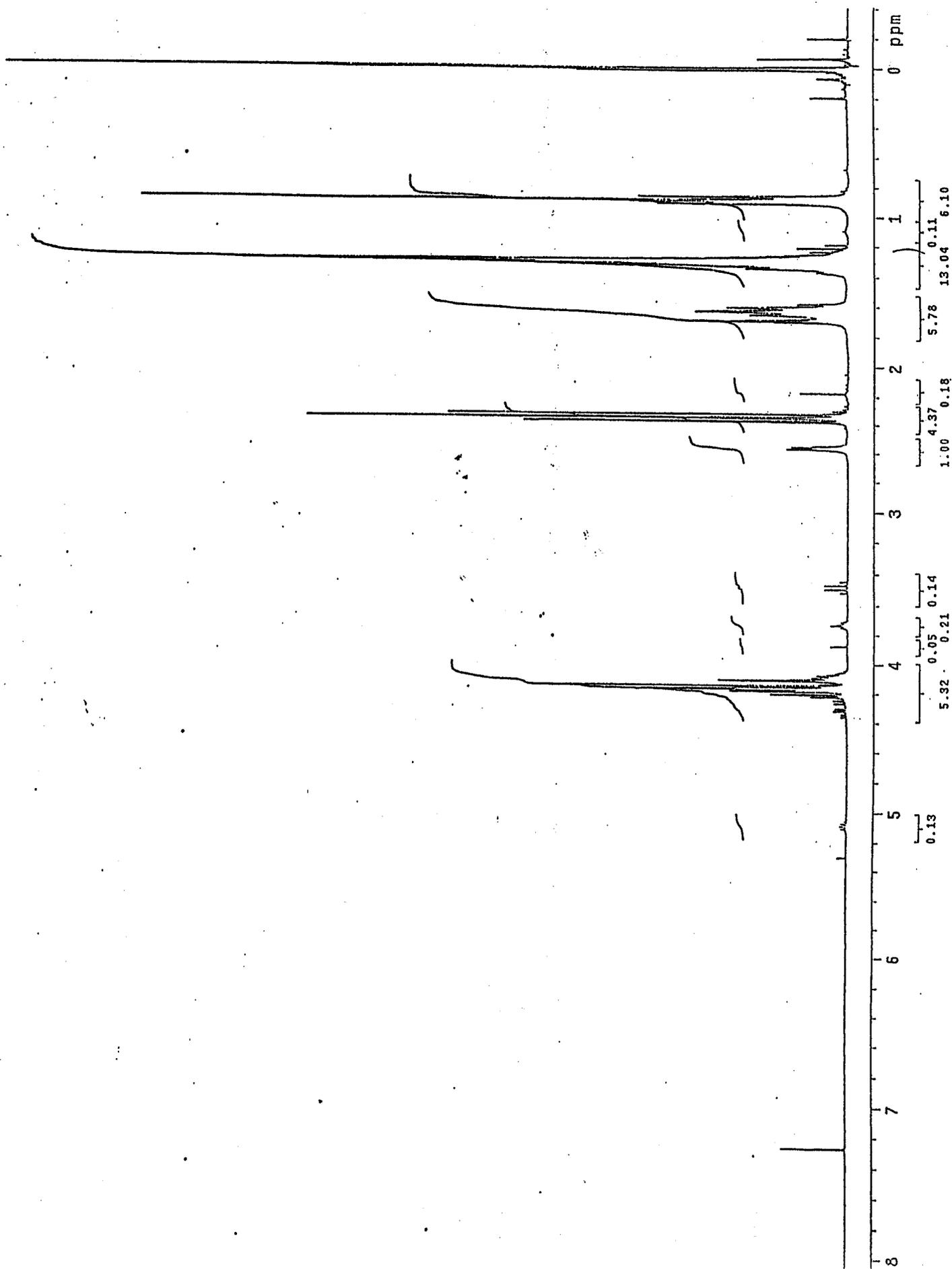


Espectro na região do Infravermelho (IVTF) da dienantina em pastilha de NaCl

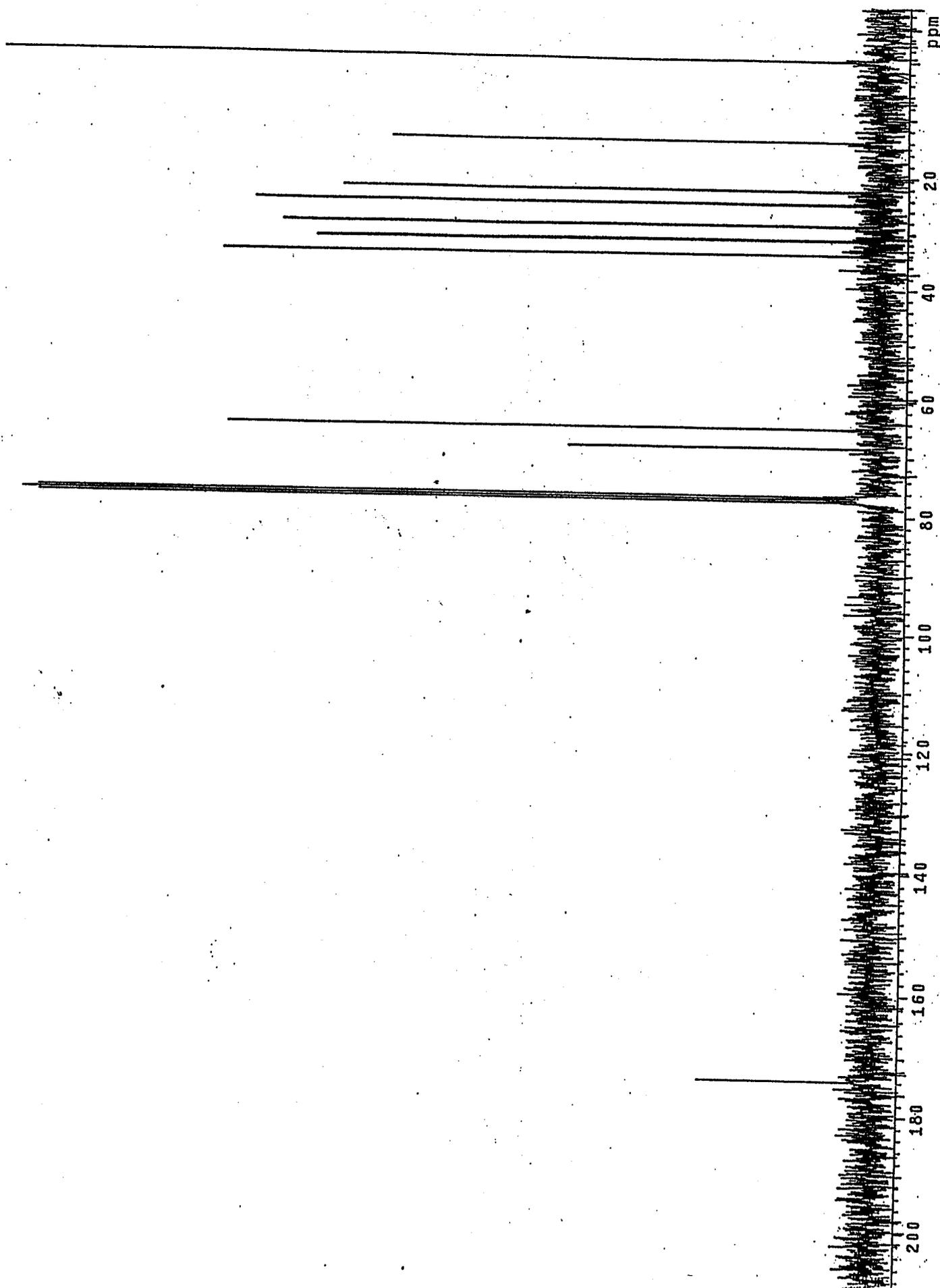


Espectro de massas da dienantina a 70 eV

Apêndice 5

Espectro de RMN ^1H da 1,3-dienantina em CDCl_3 a 400 MHz

. Apêndice 6

Espectro de RMN ^{13}C da 1,3-dienantfina em CDCl_3 a 100 MHz