

**ANA CRISTINA ROCHA ESPESCHIT**

**EFEITOS DA INGESTÃO DE FARINHA INTEGRAL DE LINHAÇA SOBRE  
FATORES DE RISCO PARA DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS  
EM RATOS *Wistar* ADULTOS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Ciência da  
Nutrição, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

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

T

E77e  
2010

Espechit, Ana Cristina Rocha, 1982-

Efeitos da ingestão de farinha integral de linhaça sobre  
fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis  
em ratos Wistar adultos / Ana Cristina Rocha Espechit.

– Viçosa, MG, 2010.

xvi, 66f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Sônia Machado Rocha Ribeiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 58-66.

1. *Linum usitatissimum* L. 2. Linhaça. 3. Ratos como  
animal de laboratório. 4. Stress oxidativo. 5. Lipídios do  
sangue. 6. Dieta. 7. Obesidade. I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 613.26

ANA CRISTINA ROCHA ESPESCHIT

**EFEITOS DA INGESTÃO DE FARINHA INTEGRAL DE LINHAÇA SOBRE  
FATORES DE RISCO PARA DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS  
EM RATOS Wistar ADULTOS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Ciência da  
Nutrição, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

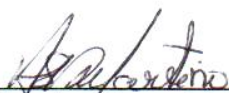
APROVADA: 19 de fevereiro de 2010.



Prof. Laércio dos Anjos Benjamin



Profª Ana Vlândia Bandeira Moreira



Profª Hércia Stampini Duarte Martino  
(Co-Orientador)



Profª Maria do Carmo Gouveia Peluzio  
(Co-Orientador)



Profª Sônia Machado Rocha Ribeiro  
(Orientador)

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

Dedico essa dissertação  
aos meus amados pais Cláudio e Maria Márcia,  
à minha irmã Ana Cláudia,  
com carinho, amor e gratidão.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por permitir sentir sua presença constante em minha vida.

Ao meu pai Cláudio, que sempre me orientou como filha e como professor, agradeço duas vezes! Obrigada pelo amor, alegria e atenção sem reservas.

À minha mãe, Maria Márcia, minha mulher maravilha e exemplo de vida, obrigada pelo amor e carinho diários e por acreditar tanto em mim.

À minha irmã, Ana Cláudia, por todo amor, incentivo, apoio incondicional e companheirismo em todos os momentos.

À toda minha família, em especial aos meus avós Jorge, Graciema, Oldemar e Francelina, pelo exemplo e amor sem limites.

Aos meus tios José Luis, Geraldo, Milton, Maurício, José Guilherme, Inês, Alda, Nísia, Augusta, Marly, Ângela, Maria José, Vera, Tânia, Luiza e tio Délio, este último onde estiver, pela torcida durante toda a minha vida.

Aos padrinhos Marcelo e Beth por estarem sempre ao meu lado.

À Prof<sup>a</sup> Sônia, minha orientadora querida, que me deu a oportunidade de aprender tanto e crescer. Obrigada pelo apoio, paciência, tranquilidade e amizade. É difícil agradecer com palavras...

À Prof<sup>a</sup> Maria do Carmo, por ter despertado em mim o amor pela ciência, obrigada pela amizade, confiança e co-orientação.

À Prof<sup>a</sup> Hércia, minha co-orientadora que sempre se fez tão presente, obrigada pela atenção, dedicação e amizade.

Ao Prof Laércio, por me iniciar na ciência e na arte da Histologia com tanta atenção, carinho, disposição e amizade.

À Prof<sup>a</sup> Ana Vlândia, pela amizade e valiosas contribuições.

Às minhas grandes amigas Flávia, Juliana e a Renatinha, por estarem há tantos anos sempre do meu lado.

Ao Dimas, por todo o carinho, companheirismo, incentivo e ajuda diária.

À Gláucia, minha companheira diária de laboratório, amiga para vida a toda.

À grande amiga Raquel, por toda amizade e apoio incondicional.

Aos amigos do mestrado, em especial as amigas Damiana, Letícia, Vaninha, Daniela, Fernanda, Érica, Clarisse, Tatiana e Lívia. Vocês são muito especiais.

À Júlia, minha “irmã de mestrado”, pelas contribuições, amizade e companheirismo.

Ao Cassiano, pelas valiosas contribuições, disposição e boa vontade.

À Ana Carolina e ao Renato, por todo o incentivo, amizade e valiosos conselhos.

À Laíse, por trazer risadas diárias para minha vida.

Ao André, mesmo de longe, pela amizade e valiosas contribuições em todas as etapas do mestrado.

Ao Keller Sullivan, por compartilhar seu grande conhecimento técnico e amizade.

Aos estagiários Álisson, Janise, Laís, Thaís, Débora, em especial à Barbara, Karla, Ana Carolina, Crislaine e Camila, serei eternamente agradecida.

Às nutricionistas Nerilda e Heloísa, com quem aprendi a amar nossa profissão e me espelho diariamente.

Aos pesquisadores do "Grupo Linhaça" do Departamento de Nutrição e Saúde, pelas valiosas contribuições produtivas e interação durante a execução dessa pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, por me acolher durante esses dois anos.

À Capes, CNPQ e Fapemig, pelo apoio financeiro.

Aos funcionários e professores do Departamento de Nutrição e Saúde e à Universidade Federal de Viçosa, pela minha formação. Eterna gratidão.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

Meu muito obrigada, de coração.

## BIOGRAFIA

Ana Cristina Rocha Espeschit, filha de Cláudio José Borela Espeschit e de Maria Márcia Rocha Espeschit, nasceu no dia 16 de julho de 1982, na cidade de Viçosa, MG.

Em abril de 2001 ingressou no curso de Nutrição da Universidade Federal de Viçosa, obtendo seu título de graduação em Nutrição em julho de 2005.

Em abril de 2007 ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, no Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

Defendeu sua dissertação aos 19 de fevereiro de 2010 para obtenção do título de *Magister Scientiae*.



## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xi
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Compostos nutricionais e bioativos da linhaça .....	4
2.2. Linhaça e redução de risco para DCNT.....	9
2.2.1. <i>Obesidade</i> .....	9
2.2.2. <i>Dislipidemias e doenças cardiovasculares</i> .....	10
2.2.3. <i>Controle glicêmico</i> .....	12
2.3. A dieta de cafeteria: um modelo experimental de dieta ocidental obesogênica.....	13
2.4. Compostos fitoquímicos .....	15
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Geral.....	19
3.2. Específicos .....	19
4. METODOLOGIA GERAL .....	20
4.1. Local de Estudo .....	20
4.2. Matéria-prima .....	20
4.3. Elaboração da farinha de linhaça .....	20
4.4. Análise da composição química centesimal da farinha de linhaça .....	20
4.5. Animais e dietas experimentais .....	21
4.6. Desenho experimental.....	23
4.7. Coleta de amostras biológicas.....	25
4.7.1. <i>In vivo</i> .....	25
4.7.2. <i>Ex-vivo</i> .....	25
4.8. Parâmetros avaliados .....	25
4.8.1. <i>Consumo alimentar e variação de peso corporal</i> .....	25
4.8.2. <i>Coeficiente de eficiência alimentar (CEA)</i> .....	25
4.8.3. <i>Teor de lipídios nas fezes</i> .....	26
4.8.4. <i>Parâmetros bioquímicos séricos</i> .....	26

4.8.5.	<i>Peroxidação lipídica</i> .....	26
4.8.6.	<i>Concentração de proteínas totais nos homogenados</i> .....	27
4.8.7.	<i>Índices hepatossomático- IHS e gonadossomático-IGS</i> .....	27
4.8.8.	<i>Medição das gotas de gordura no tecido hepático</i> .....	28
4.9.	Estatística .....	29
4.10.	Aspectos éticos .....	29
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO: .....	30
5.1.	Caracterização da farinha integral de linhaça quanto à composição química .....	30
5.2.	Composição química centesimal das dietas experimentais.....	31
5.3.	Efeitos da ingestão da farinha de linhaça sobre parâmetros fisiológicos de ratos alimentados com dieta AIN-93M.....	33
5.3.1.	<i>Ganho de peso corporal, consumo alimentar, coeficiente de eficiência alimentar e índices hepatossomático e gonadossomático</i> .....	33
5.3.2.	<i>Perfil lipídico sérico e teor de lipídios nas fezes</i> .....	35
5.3.3.	<i>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no soro e em homogenados de fígado e de testículo</i> .....	39
5.3.4.	<i>Atividade das aminotransferases séricas</i> .....	41
5.3.5.	<i>Concentração sérica de hemoglobina total (Hb) e glicada (HbA<sub>1c</sub>)</i> .....	42
5.4.	Efeitos da ingestão da farinha de linhaça sobre fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis em ratos alimentados com dieta de cafeteria.....	44
5.4.1.	<i>Consumo alimentar médio, ganho de peso corporal total, coeficiente de eficiência alimentar (CEA), índice hepatossomático- IHS e índice gonadossomático (IGS)</i> .....	44
5.4.2.	<i>Perfil lipídico sérico e teor de lipídios nas fezes</i> .....	47
5.4.3.	<i>Peroxidação de lipídios</i> .....	49
5.4.4.	<i>Atividade de aminotransferases séricas</i> .....	50
5.4.5.	<i>Concentração sérica de Hemoglobina total (Hb) e de hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>)</i> .....	51
5.4.6.	<i>Histologia hepática</i> .....	53
6.	CONCLUSÃO .....	56
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	57
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58

## ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	ácido araquidônico
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
AL	ácido linoleico
ALA	ácido $\alpha$ -linolênico
ALT	alanina aminotransferase
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	aspartato aminotransferase
CAFL	dieta de cafeteria + 12,5% de farinha de linhaça com tratamento térmico
CAF	dieta de cafeteria
CEA	ganho de peso do animal
CT	colesterol total
DCNT	doenças crônicas não transmissíveis
DHA	ácido docosaheptaenoico
DM2	<i>diabetes mellitus</i> tipo 2
EPA	ácido eicosapentaenoico
FLsTT	fibra da farinha de linhaça sem tratamento térmico
FLTT	fibra da farinha de linhaça submetida ao tratamento térmico
HDL	lipoproteína de alta densidade
IL-6	interleucina-6
LDL	lipoproteína de baixa densidade
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	proteína C reativa
SAA	soroamiloide A
SDG	seicosalariciresinol
TBARS	Teste de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TG	triacilglicerol
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral- $\alpha$
TT	tratamento térmico
VCAM	molécula de adesão de célula vascular
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa
ERO	espécies reativas de oxigênio
ERN	espécies reativas de nitrogênio

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho experimental.....	24
Figura 2 – Consumo alimentar (barras tracejadas) e ganho médio de peso corporal semanal de ratos <i>Wistar</i> tratados com dietas CAF: dieta de cafeteria (n= 10), CAFL: dieta de cafeteria + linhaça a 12,5% com TT (n= 10) e AIN-93M (n= 10). .....	46
Figura 3 - Percentual de gordura no tecido hepático de ratos <i>Wistar</i> tratados com dietas de CAF: dieta de cafeteria (n= 6), CAFL: dieta de cafeteria + linhaça a 12,5% (n= 6); e C: ração comercial (n= 6). .....	54
Figura 4 - Aspectos histológicos de fígados dos animais dos grupos experimentais. Aspecto geral das áreas de gordura encontradas nos grupos: A: CAF- dieta de cafeteria (n= 6); B: CAFL- dieta de cafeteria + linhaça a 12,5% (n= 6) e C: ração comercial (n= 6). Hematoxilina/Eosina. 50 µm.....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das dietas experimentais (g/100g de mistura).....	22
Tabela 2: Composição química centesimal da farinha integral de linhaça crua. ....	31
Tabela 3: Composição química centesimal das dietas (g/100g).....	32
Tabela 4. Consumo alimentar total, ganho de peso corporal total, coeficiente de eficiência alimentar (CEA), índice hepatossomático (IHS) e índice gonadossomático (IGS) de ratos <i>Wistar</i> alimentados com as dietas experimentais. ....	35
Tabela 5. Concentrações séricas de colesterol total (CT), triacilglicerol (TG), lipoproteína de alta densidade (HDL) e teor de lipídios nas fezes de ratos <i>Wistar</i> alimentados com as dietas experimentais.....	36
Tabela 6. Valores de TBARS no soro (mmol/mL) e em homogenados de fígado e testículo (mmol/mg) de ratos <i>Wistar</i> alimentados com as dietas experimentais. ....	40
Tabela 7. Atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) no soro de ratos <i>Wistar</i> alimentados com as dietas experimentais (U/L). ....	42
Tabela 8. Concentração sérica de hemoglobina total (Hb) e de hemoglobina glicada (HbA <sub>1c</sub> ) de ratos <i>Wistar</i> alimentados com as dietas experimentais. ....	43
Tabela 9. Consumo alimentar total, ganho de peso corporal total, coeficiente de eficiência alimentar (CEA), índice hepatossomático (IHS) e índice gonadossomático (IGS) de ratos <i>Wistar</i> alimentados com as dietas experimentais. ....	45
Tabela 10. Concentrações séricas de colesterol total (CT), triacilglicerol (TG), lipoproteína de alta densidade (HDL) e teor de lipídios nas fezes de ratos <i>Wistar</i> alimentados com as dietas experimentais.....	48

Tabela 11. Valores de TBARS no soro (mmol/mL) e em homogenados de fígado e testículo (mmol/mg) de ratos <i>Wistar</i> alimentados as dietas experimentais.....	50
Tabela 12. Atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) no soro de ratos <i>Wistar</i> alimentados as três dietas experimentais (U/L). ....	51
Tabela 13. Concentração sérica de hemoglobina (Hb) e de hemoglobina glicada (HbA <sub>1c</sub> ) de ratos <i>Wistar</i> alimentados com as dietas experimentais.....	53

## RESUMO

ESPESCHIT, Ana Cristina Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Efeitos da ingestão de farinha integral de linhaça sobre fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis em ratos *Wistar* adultos.** Orientadora: Sônia Machado Rocha Ribeiro. Co-orientadores: Hércia Stampini Duarte Martino e Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

A linhaça (*Linum usitatissimum* L), por conter vários compostos bioativos, vem sendo investigada como um alimento com potencial para reduzir riscos de doenças crônicas não transmissíveis. O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da ingestão da farinha integral de linhaça sobre fatores de risco de doenças crônicas não transmissíveis em animais alimentados com dietas equilibradas (AIN-93M) e dieta obesogênica (dieta de cafeteria), e ainda avaliar os efeitos fisiológicos entre a ingestão de farinhas integrais de linhaça crua e submetida ao tratamento térmico. Realizou-se um estudo controlado, longitudinal, com duração de 57 dias, utilizando-se 60 ratos machos adultos *Wistar*. Os animais foram distribuídos em seis grupos (n = 10), recebendo as dietas experimentais: controle-dieta equilibrada: AIN-93M; FLTT: AIN-93M contendo 50% do teor de fibras alimentares fornecido pela fibra da farinha de linhaça submetida ao tratamento térmico; FLsTT: AIN-93M contendo 50% do teor de fibras alimentares provenientes da fibra da farinha de linhaça sem tratamento térmico; CAF: controle dieta obesogênica: dieta de cafeteria; CAFL: dieta de cafeteria + 12,5% de farinha de linhaça; comercial: ração comercial (padrão histológico de roedor). Foram avaliados os seguintes parâmetros: consumo alimentar, coeficiente de eficiência alimentar (CEA), ganho de peso corporal, índices hepatossomático e gonadossomático; concentrações séricas de colesterol total, de HDL, de triacilgliceróis, de hemoglobina total e glicada e as atividades de alanina aminotransferase e de aspartato aminotransferase, teor de lipídios nas fezes e peroxidação lipídica no soro e em homogenados de fígado e de testículo, por meio do teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O padrão histológico do tecido hepático foi analisado para mensurar a deposição de gordura. Os dados foram submetidos à ANOVA, e os testes de Duncan e Kruskal-Wallis foram utilizados para discriminar diferenças entre médias, adotando-se o nível de significância de 0,05. A ingestão de dieta AIN-93M contendo linhaça reduziu os

níveis séricos de triacilglicerol, colesterol total e de TBARS no soro, aumentou a excreção de lipídios pelas fezes e elevou o índice hepatossomático dos animais. A farinha de linhaça sem tratamento térmico reduziu o consumo alimentar diário, sem alterar o CEA. HDL, aspartato e alanina aminotransferases, hemoglobina total e glicada, bem como TBARS nos homogenados de fígado e testículo e índice gonadossomático não apresentaram diferença entre os grupos experimentais. A dieta de cafeteria, em comparação com a dieta AIN-93M, promoveu menor consumo alimentar e elevação de CEA, TBARS do fígado, alanina aminotransferase, hemoglobina total, hemoglobina glicada, maior deposição de gordura hepática e redução do colesterol total. A adição de linhaça na dieta de cafeteria causou os seguintes efeitos: diminuição dos níveis séricos de triacilgliceróis, aumento da excreção de lipídios fecais quando comparados com os grupos AIN-93M e CAF, diminuindo para níveis fisiológicos a concentração da hemoglobina glicada aumentada na dieta de cafeteria. A adição de linhaça não influenciou o peso corporal dos animais, os níveis séricos de HDL e a relação CT/HDL, a concentração de TBARS no soro e em homogenados de testículo, as atividades de aspartato e os índices hepatossomáticos e gonadossomáticos. Concluiu-se que as farinhas de linhaça integral crua ou processada termicamente apresentaram efeitos similares na maioria dos parâmetros avaliados, exceto para a ingestão alimentar, que foi menor para a forma crua, embora esse efeito não tenha resultado em menor ganho de peso corporal. A farinha integral de linhaça induziu efeitos fisiológicos positivos nas duas diferentes condições nutricionais, mas a modulação do perfil de lipídios séricos, considerado um importante fator de risco de doenças cardiovasculares, foi dependente da qualidade da dieta. Quando adicionada na dieta equilibrada (AIN-93M), a linhaça apresentou efeito hipocolesterolêmico, mas na dieta com elevado teor de lipídios (dieta de cafeteria), ela mostrou efeito hipercolesterolêmico, provavelmente por aumentar a síntese de lipoproteínas carreadoras de colesterol. A farinha integral de linhaça também atenuou a glicação de proteínas induzida pela dieta de cafeteria. Esses resultados sugerem uma nova perspectiva para a alegação funcional de alimentos, uma vez que alimentos ricos em compostos bioativos podem apresentar efeitos fisiológicos benéficos, mesmo na presença de dieta desequilibrada.



## ABSTRACT

ESPESCHIT, Ana Cristina Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2010. **Effects of the ingestion of integral linseed flour on risk factors for non-transmissible chronic diseases in adult *Wistar* rats.** Advisor: Sônia Machado Rocha Ribeiro. Co-advisors: Hércia Stampini Duarte Martino and Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

Linseed (*Linum usitatissimum* L.), due to its various bioactive compounds, has been investigated as a nourishment with the potential to reduce risks of non-transmissible chronic diseases. The objective of the present study was to investigate the effects of the ingestion of integral linseed flour on non-transmissible chronic disease risk factors in animals given balanced diets (AIN-93M) and obesogenic diet (cafeteria diet), as well as evaluate the physiological effects between ingestion of raw integral linseed flours and those submitted to heat treatment. A controlled, longitudinal study was performed, with duration of 57 days utilizing 60 adult male *Wistar* rats. The animals were distributed in six groups (N = 10), receiving one of the experimental diets: AIN-93M; FLTT: AIN-93M containing 50% of the dietary fiber content supplied by linseed flour submitted to thermal treatment; FLsTT: AIN-93M containing 50% of the nutritional fiber content supplied by raw linseed flour; CAF: obesogenic control diet: cafeteria diet; CALF: cafeteria diet + 12.5% linseed flour; commercial: commercial meal (histological standard for rodents). The following parameters were evaluated: food intake, food efficiency ratios (FER), weight gain, hepatosomatic and gonadosomatic indices; serum concentrations of total cholesterol, HDL, triacylglycerides, total and glycated hemoglobin and the activities of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase, lipid concentration in the feces and lipid peroxidation in the serum and in homogenates of the liver and testicles, by means of the test for thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The histological pattern of the hepatic tissue was analyzed to measure fat deposits. Data was submitted to an ANOVA and the Duncan and Kruskal-Wallis tests were utilized to discriminate differences between the averages, using a significance level of 0.05. Ingestion of the AIN-93M diet containing linseed reduced the levels of triacylglycerides, total cholesterol, and TBARS in the serum, and increased the excretion of lipids in the feces and elevated the hepatosomatic index of the animals. Raw linseed

flour reduced daily feed consumption, without altering the FER. HDL, aspartate and alanine aminotransferases, total and glycated hemoglobin, as well as TBARS in the homogenates of the liver and testicles, and gonadosomatic index did not present differences between the experimental groups. The cafeteria diet, compared with the AIN-93M diet, promoted lower feed consumption and elevation of FER, TBARS in the liver, alanine aminotransferase, total hemoglobin, glycated hemoglobin, greater deposits of hepatic fat and reduction of total cholesterol. Addition of linseed to the cafeteria diet caused the following effects: decrease in serum levels of triacylglycerides, increase in extraction of lipids in the feces compared with the AIN-93M and CAF groups, decreasing for physiological values the concentration of glycated hemoglobin which is elevated in the cafeteria diet. Addition of linseed did not influence body weight of the animals, serum levels of HDL and the CT/HDL ration, concentration of TBARS in the serum and in homogenates of the testicle, aspartate activities and the hepatosomatic and gonadosomatic indices. It was concluded that the raw or heat processed integral linseed flours presented similar effects on the majority of the evaluated parameters, except for feed ingestion which was less for the raw form. However this effect did not results in greater weight gain. The integral linseed flour induced positive physiological effects in the two different nutritional conditions, but modulation of the serum lipid profile, which is considered an important risk factor of cardiovascular diseases, was dependent on the quality of the diet. When added to the balanced diet (AIN-93M), linseed presented a hypocholesterolemic effect, but the diet with an elevated lipid concentration (cafeteria diet) demonstrated a hypercholesterolemic effect, probably by increasing synthesis of lipoprotein cholesterol carriers. The integral linseed flour also reduced protein glycation induced by the cafeteria diet. These results suggest a new perspective for the functional claim of foods, since aliments rich in bioactive compounds may present beneficial physiological effects, even in the presence of an unbalanced diet.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O aumento da expectativa média de vida da população e a elevada incidência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) têm levantado uma questão mundial sobre a necessidade de se adotar uma alimentação saudável, buscando os efeitos positivos dos alimentos na redução de DCNT.

É nessa perspectiva que a linhaça, semente oleaginosa proveniente da planta do linho (*Linum usitatissimum* L.), vem sendo estudada em razão das suas potenciais propriedades funcionais. Estudos têm apontado os benefícios da ingestão da linhaça na redução de fatores de risco de algumas DCNT, atribuídos à ação de diversos compostos bioativos contidos na semente, resultando na modulação positiva de mecanismos fisiológicos, cuja homeostase se rompe durante a instalação e/ou progressão de doenças cardiovasculares, câncer, obesidade e diabetes.

A linhaça é considerada fonte alimentar de ácido graxo  $\omega$ -3, de lignanas e de fibra alimentar. Atualmente, os principais produtos de linhaça disponíveis no mercado para o consumo humano estão sob quatro principais formas: sementes integrais, sementes integrais trituradas (farinha de linhaça), farinha de linhaça desengordurada e óleo de linhaça (BASSETT *et al.*, 2009). Quando ingeridas na forma íntegra, o organismo apresenta dificuldade de romper a parede celular da semente dicotiledônea (ELLIS *et al.*, 2004), reduzindo assim a biodisponibilidade dos nutrientes da semente (AUSTRIA *et al.*, 2008). O óleo de linhaça não contém as fibras alimentares e as lignanas, ao passo que a linhaça desengordurada não é uma fonte do ácido graxo ômega-3 (BASSETT *et al.*, 2009). Assim, os benefícios à saúde advindos do consumo da linhaça dependem do tipo de produto e da forma de consumo da semente. É grande o número de estudos em animais e humanos para investigar as propriedades funcionais da linhaça (AUSTRIA *et al.*, 2008; BARCELO-COBLIJN *et al.*, 2008; ANDER *et al.*, 2009; DUDA *et al.*, 2009; FERNANDEZ *et al.*, 2009; NEWAIRY; ABDOU, 2009).

Entretanto, uma questão pouco explorada nos estudos sobre o uso de linhaça na alimentação humana é a existência de fatores antinutricionais e tóxicos presentes na semente, especialmente compostos cianogênicos. Afirma-se que estes fatores são tóxicos ao organismo humano e, quando ingeridos em

doses a partir de 200 mg, podem ser letais para indivíduos adultos (CONN, 1969). Sabe-se que o processamento térmico pode reduzir o teor desses compostos na semente de linhaça (CUNNANE *et al.*, 1993; OOMAH ; MAZZA, 1998) sem alterar a estabilidade oxidativa (MARQUES, 2008; MORAES *et al.*, 2008). Assim, a ingestão de linhaça na forma de farinha integral, submetida ao processamento térmico, constitui uma estratégia adequada para utilização da semente na alimentação humana, por assegurar o fornecimento dos vários compostos bioativos de uma maneira mais biodisponível e eliminar os compostos cianogênicos.

A caracterização nutricional da farinha mostrou que ela é uma fonte de ácidos fenólicos (STRANDAS *et al.*, 2008), vitamina E (CARRARO *et al.*, 2009), ácido linolênico e fibras alimentares (CARRARO *et al.*, 2009), contendo ainda cálcio, ferro, zinco, manganês e magnésio (CARRARO, 2009). Estudos recentes do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV) mostraram que a farinha de linhaça apresenta estabilidade oxidativa durante os processamentos térmico e mecânico e durante o armazenamento por 60 dias, com preservação do ácido linolênico e da vitamina E (CARRARO *et al.*, 2009). Esses resultados reforçam o interesse no uso da linhaça como um alimento com propriedades funcionais, pois, além de fornecer calorias e melhorar a relação entre ácidos graxos poli-insaturados e saturados da dieta, supre a mesma com alguns compostos bioativos tais como ácido linolênico, fibra alimentar, vitamina E e antioxidantes em geral.

A linhaça é considerada um alimento funcional em alguns países (PATADE *et al.*, 2008), mas a legislação brasileira não define alimento funcional, e sim alegação de propriedade funcional e de saúde (BRASIL, 1999a; 1999b), e entre os compostos bioativos que apresentam alegação de propriedade funcional e/ou de saúde relacionados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), estão as fibras alimentares e os ácidos graxos  $\omega$ -3.

No Brasil, o consumidor tem sido estimulado a incluir a linhaça na alimentação em decorrência da divulgação, pela mídia e meios científicos, de seus benefícios à saúde. Entretanto, não há ainda conhecimento suficiente para garantir a inexistência de algum efeito tóxico proveniente do consumo contínuo da linhaça crua contendo compostos antinutricionais, tais como os

inibidores de tripsina (JACINTO, 2007), o ácido fítico (MARQUES, 2008), o tanino (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2007) e os glicosídeos cianogênicos (CUNNANE *et al.*, 1993). Também os efeitos diferenciados do consumo crônico de alimentos ricos em fitoestrógenos em ambos os gêneros (masculino e feminino) nas diversas faixas etárias não são totalmente conhecidos para animais e seres humanos. Portanto, são necessários mais estudos sobre os efeitos fisiológicos e toxicológicos da ingestão de linhaça, sob formas variadas, para complementar os conhecimentos visando ao uso dietético seguro dessa semente por seres humanos.

Diante das considerações anteriores, o presente trabalho foi proposto com o objetivo de estudar, em modelo animal, os efeitos da ingestão da farinha integral de linhaça sobre parâmetros fisiológicos relacionados aos riscos de DCNT.

A hipótese do trabalho baseou-se na premissa de que a ingestão da farinha de linhaça por grupos de animais alimentados com dieta AIN-93M (dieta equilibrada) e dieta de cafeteria (dieta obesogênica) poderia exercer efeitos fisiológicos diferenciados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Compostos nutricionais e bioativos da linhaça

A linhaça ou semente do linho (*Linum usitatissimum*, Linaceae) vem sendo cultivada na Europa e Ásia desde 5.000 a.C., sendo, anteriormente, utilizada principalmente para a fabricação de tecidos, papéis, extração e comercialização do óleo e de seu subproduto para a fabricação de rações animais (BERGLUND, 2002). O maior produtor mundial de linhaça é o Canadá, responsável por 75% do comércio mundial (OOMAH ; MAZZA, 1999). Na última década, o uso do linho tem sido ampliado em todo o mundo. A semente tem sido utilizada na indústria de alimentos devido à sua composição em macro e micronutrientes e em compostos com potencial de bioatividade (BLOEDON; SZAPARY, 2004; KHAN *et al.*, 2007). Assim, a incorporação destes compostos na alimentação é atrativa (BABU *et al.*, 2003) na perspectiva de desenvolvimento de alimentos com benefícios para a saúde (MEAGHER; BEECHER, 2000).

O linho é uma cultura de flores azuis que produz pequenas sementes. (BLOEDON; SZAPARY, 2004). A semente do linho é chata e oval, possui uma extremidade pontiaguda e sua coloração varia do marrom avermelhado ao amarelo claro (COSKUNER; KARABABA, 2007). Pouca atenção tem sido dada aos estudos comparativos entre sementes de cores diferentes. Mas estudos recentes desenvolvidos no Departamento de Nutrição da UFV mostraram que as linhaças dourada e marrom se assemelharam na composição de nutrientes, embora a semente marrom tenha teor de antioxidantes mais elevado do que a dourada (RIBEIRO, dados não publicados).

A linhaça é comumente encontrada no mercado na forma de sementes inteiras, processadas como farinha desengordurada ou não, e óleo. (BLOEDON; SZAPARY, 2004). Apresenta aproximadamente 8% de umidade, 20% de proteína, 18% de fibra alimentar e 40% de lipídios (CINTRA *et al.*, 2006), dos quais mais de 50% é constituído pelo ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA) da família  $\omega$ -3 (CUNNANE, 1993; BASSETT *et al.*, 2009). É considerado um alimento de alta densidade energética, e a semente é classificada como oleaginosa devido a seu alto teor de lipídios (LEI *et al.*, 2003). Contém ainda

vitaminas E (OOMAH *et al.*, 1997), C e do complexo B, e possui minerais como potássio e fósforo (MARQUES, 2008), compostos fenólicos como lignanas (MEAGHER; BEECHER, 2000; BERGLUND, 2002) e outros fenólicos glicosilados (STRANDÅS *et al.*, 2008).

Devido à sua composição em compostos bioativos como ácido  $\alpha$ -linolênico, lignanas, fibras alimentares, compostos fenólicos e vitamina E, evidências apontam para o consumo da semente, visando à promoção da saúde e diminuição dos riscos das DCNT (BABU *et al.*, 2003; KHAN *et al.*, 2007; BASSETT *et al.*, 2009).

O conceito de funcionalidade de alimentos está atrelado à ideia de benefícios específicos à saúde, além do fornecimento de nutrientes (OOMAH, 2001). A linhaça é considerada um alimento funcional em alguns países, como o Canadá (OOMAH; MAZZA, 1999; OOMAH, 2001). No Brasil, embora a legislação não defina alimento funcional, há uma regulamentação para alegação de propriedade funcional e de saúde de compostos bioativos e de alimentos (BRASIL, 1999a; 1999b). Segundo critérios estabelecidos pela Anvisa (1999b), são permitidas as seguintes alegações funcionais ou de saúde às fibras alimentares e aos ácidos graxos  $\omega$ -3: “O consumo de ácidos graxos ômega 3 auxilia na manutenção de níveis saudáveis de triglicerídeos, desde que associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”, e “As fibras alimentares auxiliam o funcionamento do intestino. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”. Porém, para o ácido graxo  $\omega$ -3, há o seguinte requisito específico: “Esta alegação somente deve ser utilizada para os ácidos graxos  $\omega$ -3 de cadeia longa provenientes de óleos de peixe (EPA - ácido eicosapentaenóico e DHA – ácido docosahexaenóico)” (BRASIL, 1999b).

Os ácidos graxos da série  $\omega$ -3 (linolênico, EPA e DHA) são encontrados nos vegetais (soja, canola e linhaça) e em peixes de águas frias (cavala, sardinha, salmão, arenque) (IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE, 2007). O percentual de  $\omega$ -3 encontrado na linhaça é 5,5 vezes maior que em outras fontes alimentares desse ácido graxo, como canola e nozes (BLOEDON; SZAPARY, 2004). A linhaça contém cerca de 40% de lipídios, constituídos de 53% de

ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA), 17% de linoléico (AL), 17% de oleico, 3% de esteárico e 5% de palmítico (PELLIZZON *et al.*, 2007).

Os ácidos graxos da série  $\omega$ -6, representados pelo AL e araquidônico (AA), são encontrados principalmente nos óleos de soja, milho e girassol (IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE, 2007).

Em razão de seu elevado teor de ácido linolênico, a linhaça tem sido identificada como uma fonte de ácidos graxos  $\omega$ -3, podendo exercer importantes benefícios para a saúde cardiovascular (BASSETT *et al.*, 2009). Sabe-se que ácidos graxos dessa série promovem redução dos triacilgliceróis plasmáticos pela diminuição da síntese hepática de VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa), podendo ainda exercer outros efeitos cardiovasculares, como redução da viscosidade do sangue, maior relaxamento do endotélio, além de exercer efeitos antiarrítmicos (IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE, 2007). Portanto, os ácidos graxos  $\omega$ -3 são indicados pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (2007) como terapia adjuvante na hipertrigliceridemia ou em substituição a fibratos, niacina ou estatinas em pacientes intolerantes a esses medicamentos. A Anvisa (1999 b) permite que a alegação de funcionalidade seja dos  $\omega$ -3 provenientes somente dos óleos de peixe. Duda *et al.*(2009) também sugerem que apenas o  $\omega$ -3 proveniente dos peixes, com o EPA e DHA pré-formados, possuem efeitos anti-inflamatórios e com atuação na prevenção de patologias cardiovasculares, e não os ALA provenientes de fontes vegetais. Porém, estudos demonstraram efeitos benéficos na saúde tanto da ingestão da linhaça (DUPASQUIER *et al.*, 2006; PATADE *et al.*, 2008), quanto do óleo da linhaça (RALLIDIS *et al.*, 2003; CINTRA *et al.*, 2006; BARCELO-COBLIJN *et al.*, 2008).

Os ácidos graxos das séries  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 são essenciais e, portanto, podem ser obtidos somente pela alimentação. Depois de consumidos, os ALA da série  $\omega$ -3 e AL da série  $\omega$ -6 podem ser convertidos em diferentes classes de eicosanoides, que possuem diferentes efeitos sobre a inflamação, a agregação plaquetária e a vasoconstrição. O AL pode ser convertido em AA, prostaglandina E2, tromboxano A2 e leucotrieno B4 (BLOEDON; SZAPARY, 2004). O ALA, por ser um ácido graxo poli-insaturado, pode ser metabolizado a



outros ácidos graxos poli-insaturados como o EPA e DHA, que são a forma comumente encontrada no óleo de peixe (ANDER *et al.*, 2009). Essa conversão foi demonstrada “in vivo” por Ander *et al.* (2009), ao adicionarem 10g/dia da semente linhaça na alimentação de coelhos, por oito semanas. Observaram níveis de ALA significativamente elevados, principalmente no coração, fígado, além do plasma e rins. Este aumento foi acompanhado por aumento nas concentrações de EPA e DHA em vários tecidos, principalmente no coração e nos rins. O metabolismo de  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 requer a mesma enzima de dessaturação, o que leva a uma competição de ambos os substratos pela enzima. Logo, o excesso de uma classe de ácidos graxos poli-insaturados ( $\omega$ -3 ou  $\omega$ -6) pode levar à produção de eicosanoides específicos, que têm diferentes efeitos na inflamação, na agregação plaquetária e na vasoconstrição (BLOEDON; SZAPARY, 2004).

Os eicosanoides produzidos por EPA e DHA estão envolvidos na diminuição da agregação plaquetária, da vasoconstrição e da trombose. Os eicosanoides derivados do AA produzem efeitos opostos (KINSELLA *et al.*, 1990; BLOEDON; SZAPARY, 2004). Desta forma, o aumento dietético do consumo de ALA pode estar associado à produção de eicosanoides menos inflamatórios se relacionando à diminuição de fatores aterogênicos.

A dieta ocidental possui, atualmente, relação elevada de n -6: n -3, na faixa de 15:1 a 16,7:1. Razões menores têm sido relacionadas a melhorias da qualidade de vida e redução de mortes por doenças cardiovasculares, e a razão n -6: n-3 ótima varia de indivíduo para indivíduo, de acordo com o quadro de saúde (MARQUES, 2008; SIMOPOULOS, 2008).

Um estudo promovido com indivíduos dislipidêmicos verificou a diminuição de marcadores inflamatórios, como proteína C reativa (PCR), soroamiloide A (SAA) e também de interleucina-6 (IL-6) ao administrar na dieta o óleo de linhaça (15mL/dia) por três meses (RALLIDIS *et al.*, 2003). Estudos de Barcelo-Coblijn *et al.* (2008) mostraram aumento das concentrações de ALA, EPA e DHA nos fosfolípidios da membrana eritrocitária dos indivíduos após suplementação com diferentes concentrações de óleos de linhaça ou de peixe por 12 semanas. O DHA aumentou apenas nos grupos que receberam cápsulas de óleo de peixe. Esse estudo, entretanto, não demonstrou alterações

em marcadores inflamatórios estudados (PCR, Molécula de Adesão de Célula Vascular- VCAM, Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ - TNF- $\alpha$ ).

A linhaça também contém as lignanas, metabólitos secundários de plantas (JOHNSON, 2004). A linhaça é a maior fonte de lignana conhecida, com aproximadamente 301129  $\mu\text{g}/100\text{g}$ , representada principalmente por secoisolariciresinol (294210  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ), matairesinol (553  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ), lariciresinol (3041  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) e pinocresinol (3324  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) (MILDER *et al.*, 2005). Os benefícios da lignana estão relacionados às suas propriedades estrogênicas (BASSETT *et al.*, 2009) e a antioxidantes (PRASAD, 2005), com redução de risco de doenças coronarianas e de câncer (MEAGHER; BEECHER, 2000; FRANK *et al.*, 2004). Secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol e pinocresinol podem ser convertidos em enterolignanas (enteroldiol e enterolactona) na microflora intestinal (MILDER *et al.*, 2005), as quais são fitoestrógenos. As lignanas são absorvidas no cólon, conjugadas no fígado com o ácido glucurônico e o sulfato, excretadas na urina e bile (BLOEDON; SZAPARY, 2004). A excreção da lignana na urina é proporcional à quantidade ingerida e não se altera com o processamento e aquecimento da linhaça (NESBITT *et al.*, 1999; MILDER *et al.*, 2005).

Dentre os compostos bioativos da linhaça, destacam-se, também, as fibras alimentares, que são constituídas por fibras alimentares solúveis (25%) e insolúveis (75%) (BLOEDON; SZAPARY, 2004). A recomendação de ingestão de fibra alimentar total pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (2007) para adultos é de 20 a 30 g/dia. Destas, 5 a 10g devem ser solúveis, como medida adicional para a redução do colesterol (IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE, 2007). Para atender a essa recomendação, seria necessária a ingestão de 110 a 166 g de linhaça, se ela fosse a única fonte de fibras alimentares da dieta.

Os efeitos hipocolesterolêmicos das fibras alimentares solúveis estão relacionados à diminuição da absorção de lipídios e da reabsorção de sais biliares, aumentando a excreção fecal do colesterol e reduzindo os níveis de colesterolemia. São diversos os mecanismos que justificam essa diminuição. Por um lado, a fibra sequestra em sua matriz os produtos da degradação da gordura (colesterol e triacilgliceróis), diminuindo subsequentemente sua absorção. Por outro lado, a fibra alimentar sequestra os ácidos biliares que são

excretados nas fezes, interferindo na sua circulação enteroepática, acarretando uma diminuição do colesterol plasmático, visto que este será utilizado para sintetizar ácidos biliares adicionais para compensar a eliminação (EUFRÁSIO, 2003).

Pellizzon *et al.* (2007) tentaram identificar por qual mecanismo a linhaça exerceria o efeito hipolipemiante. Para este fim, usaram como modelos os animais transgênicos com deleção dos receptores de captação de LDL (lipoproteína de baixa densidade), aliado ao fornecimento de dieta ocidental (composta por 0,1% de colesterol e 30% de calorias provenientes de gordura) com 20% de linhaça. Esses autores não encontraram alterações na expressão de genes envolvidos com enzimas do metabolismo do colesterol (enzimas da síntese, captação de colesterol, síntese de ácidos biliares e de secreção de VLDL) e redução plasmática de colesterol, independentemente dos receptores de captação de LDL pelos ratos transgênicos, sugerindo que a ação hipolipemiante é atribuída à ação das fibras alimentares.

Com base na forte relação entre alimentação e DCNT, a caracterização de compostos bioativos nos alimentos vem sendo intensamente investigada por cientistas em todo o mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 58% do total de mortes do mundo e 45% da carga global de doenças ocorram em virtude das DCNT, como diabetes, câncer, hipertensão arterial, dislipidemias, obesidade, doenças cardiovasculares e doenças respiratórias WHO (2002), justificando a busca de conhecimentos acerca das propriedades fisiológicas ou funcionais dos compostos ativos dos alimentos.

## **2.2. Linhaça e redução de risco para doenças crônicas não transmissíveis**

### **2.2.1. Obesidade**

Dentre as DCNT, a que, epidemiologicamente, mais cresce no mundo é a obesidade, tornando-se um dos maiores problemas de saúde pública (NAVES; PASCHOAL, 2007). Esse distúrbio nutricional está frequentemente associado com hiperlipidemia, resistência à insulina e inflamação (FAINTUCH *et al.*, 2007), condições intimamente relacionadas com as doenças cardiovasculares.

Estudos demonstraram a ação da linhaça sobre a manutenção do peso corporal. Oliveira, (2006) mostrou tendência à manutenção do peso corporal em indivíduos alimentados com linhaça, apesar da elevada densidade energética desta semente. Esse efeito foi atribuído à maior excreção fecal de lipídios e redução da absorção energética. Cintra *et al.* (2006) também demonstraram efeito da manutenção do peso corporal em ratos *Wistar* alimentados com óleo linhaça. Pacientes com obesidade mórbida, ao receberem farinha de linhaça dourada (30 g/dia) durante duas semanas, não apresentaram alterações significativas do peso corporal, o que provavelmente pode ser atribuído ao curto tempo de observação. Porém, foi observada redução significativa dos níveis séricos de marcadores inflamatórios (PCR) e SAA, os quais estavam aumentados nessa população (FAINTUCH *et al.*, 2006).

Estudo de Fukumitsu *et al.* (2008) verificou aumento dos níveis de adiponectina e diminuição da dislipidemia, hipercolesterolemia, hiperinsulinemia e liperleptinemia, ao administrar 0,5 a 1% de lignana da linhaça isolada na dieta hiperlipídica de ratos C57BL/6 por quatro semanas

Sabe-se que o aumento de peso corporal, frequentemente, se associa à elevação da incidência de doenças não transmissíveis, como hipertensão, diabetes, resistência à insulina e câncer. Assim, a evidência dos efeitos da linhaça sobre o peso corporal poderá trazer inúmeros benefícios à saúde da população (OLIVEIRA, 2006) relacionados à obesidade e suas complicações.

### **2.2.2. Dislipidemias e doenças cardiovasculares**

As dislipidemias são importantes fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, assim como o estresse oxidativo (PRASSAD, 2005). Os principais mecanismos propostos para ação antiaterogênica da linhaça são o efeito antioxidante das lignanas (PRASAD, 2005) e o efeito antiinflamatório dos ácidos graxos  $\omega$ -3 (BASSETT *et al.*, 2009).

A Sociedade Brasileira de Cardiologia (2007) recomenda o uso de ácidos graxos  $\omega$ -3 como terapia coadjuvante na hipertrigliceridemia, e das fibras alimentares como medida adicional para redução do colesterol. Os antioxidantes são recomendados como parte da alimentação equilibrada e não em nível de suplementação. A linhaça reúne esses três compostos: ácidos

graxos  $\omega$ -3, fibras alimentares e antioxidantes, que podem auxiliar no tratamento das dislipidemias.

Vários estudos demonstraram a ação da linhaça nas dislipidemias. Patade *et al.* (2008), ao incorporarem 30g de linhaça na dieta de mulheres hipercolesterolêmicas pós-menopausa, por três meses, demonstraram alteração no perfil lipídico com redução sérica do colesterol e do LDL. Efeito semelhante foi encontrado em estudo com ratos *Wistar*, os quais receberam dieta hipercolesterolêmica (1% de colesterol) adicionada de linhaça e semente de abóbora com intuito de fornecer  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 na proporção 5:1 (MAKNI *et al.*, 2008). Esses animais, após 30 dias, apresentaram redução da fração LDL. Nesse estudo foram observados aumento de 30% do HDL e diminuição de 42% dos níveis de colesterol hepático.

Prasad (1997) mostrou que o acréscimo de 7,5g de semente de linhaça por kg de peso corporal de coelhos, por oito semanas, reduziu em 42% o desenvolvimento das placas ateroscleróticas da aorta de coelhos submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica (acrécimo de 1% de colesterol na dieta comercial para coelhos), sem alterar colesterol total (CT) e triacilgliceróis séricos. Posteriormente, repetiu-se o estudo utilizando uma cultivar de linhaça com menor quantidade de  $\omega$ -3 (2 a 3% do total do óleo) e foram observadas diminuição de 69% do desenvolvimento das placas e redução de CT (31%), LDL (32%), CT/HDL (34%), nenhum efeito significativo na HDL e TG séricos e aumento da fração VLDL (PRASAD *et al.*, 1998). Os autores atribuíram o efeito antiaterogênico da linhaça aos antioxidantes da linhaça, tais como lignanas e vitamina E, mas não ao  $\omega$ -3 (PRASAD *et al.*, 1998). Em estudo posterior, também feito com coelhos, foi adicionada a lignana isolada (40mg/kg peso corporal) às dietas hipercolesterolêmicas (0,5% de colesterol), durante dois meses. Nesse estudo, Prasad, (2005) observou redução de 34% do desenvolvimento da placa de ateroma, redução do colesterol total sérico e LDLc, aumento do HDLc e diminuição da peroxidação lipídica no plasma. Os autores associaram a redução do desenvolvimento das placas à redução do estresse oxidativo e dos lipídios séricos (PRASAD, 2005). Em 2008, outro estudo do mesmo autor sugeriu que a redução do estresse oxidativo ocorreu em consequência da redução da colesterolemia, visto que essa redução

ocorreu quando a dieta hipercolesterolêmica foi substituída por dieta equilibrada, independentemente da adição das lignanas (PRASAD, 2008).

Outros estudos, comentados a seguir, falharam em demonstrar efeitos benéficos de bioativos da linhaça sobre fatores de risco de DCNT. Frank *et al.* (2004) não observaram alterações nas concentrações de colesterol total e de triacilgliceróis plasmáticos ao administrarem 1,0% da lignana seicosalariciresinol (SDG) à dieta controle de animais Sprague–Dawley, durante 27 dias, além de inexplicável redução dos níveis de  $\alpha$  e  $\gamma$ -tocoferol no plasma e no fígado dos animais. Cintra *et al.* (2006), ao administrarem 10% de óleo de linhaça à dieta hiperlipídica (contendo 1% colesterol e 5% de banha) a ratos *Wistar*, por 28 dias, observaram menores níveis de colesterol plasmático em relação à truta, amendoim e pele de frango. Neste estudo, o efeito foi atribuído ao conteúdo levado de ácido graxo  $\alpha$ -linolênico do óleo de linhaça (ALA da série  $\omega$ -3).

Portanto, as evidências científicas têm indicado que a linhaça integral, contendo tanto as lignanas, quanto o  $\omega$ -3 e as fibras alimentares, teria um somatório de efeitos benéficos devido às várias ações de bioativo, o que parece demonstrar o impacto positivo sobre a lipemia quando se compara com estudo isolado de um único composto bioativo. O modelo experimental de dieta indutora de dislipidemia também em animais pode influenciar os resultados, visto que a adição da linhaça ou do composto bioativo isolado administrado junto à dieta pode atuar corrigindo algum desvio, seja no perfil lipídico ou no estresse oxidativo.

### **2.2.3. Controle glicêmico**

Efeitos benéficos da linhaça sobre o controle glicêmico também foram demonstrados (OOMAH, 2001; PRASAD, 2001). A avaliação do controle glicêmico na prática clínica é feita pela utilização de dois recursos laboratoriais: os testes de glicemia e os testes de proteínas glicadas, dentre elas a hemoglobina. Os testes de glicemia mostram o nível glicêmico instantâneo no momento do teste, já a hemoglobina glicada é um exame que avalia a glicemia média pregressa dos últimos dois a quatro meses (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2008).

Pacientes diabéticos, ao receberem 360 mg de lignana na forma de cápsulas, apresentaram redução significativa nos níveis de hemoglobina glicada (redução de 0,7%) e na resistência à insulina (redução de 3,4% do índice HOMA-IR) comparados com o grupo que não recebeu a lignana (PAN *et al.*, 2009). As lignanas da linhaça também mostraram ação na prevenção do desenvolvimento do diabetes em estudo que investigou o efeito de dieta rica em lignanas em ratos modelo para o desenvolvimento de *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2). A dieta foi adicionada ou não de 40 mg/kg/dia de lignana isolada da linhaça. Após 10 semanas, apenas 20% de ratos tratados com lignana desenvolveram DM2. O mecanismo de desenvolvimento do diabetes foi relacionado ao aumento do estresse oxidativo, pois ao estimar o malondialdeído sérico de ratos que receberam lignana, foram encontrados níveis menores deste marcador, diminuindo o estresse oxidativo e o risco do desenvolvimento de diabetes (PRASAD, 2001).

Ao investigar a ação da adição da farinha de linhaça em indivíduos saudáveis, Cunnane *et al.* (1993) demonstraram redução da glicemia. Neste estudo, foi administrada farinha de linhaça isoladamente ou acrescentada a pães (250 g de farinha linhaça/kg), totalizando 50 g de farinha de linhaça/dia por quatro semanas. Os indivíduos apresentaram redução significativa da glicemia (redução de 30% da curva glicêmica).

A administração de óleo de linhaça isolado não mostrou efeito na redução da glicemia, da hemoglobina glicada e da insulina dos pacientes portadores de DM2 no estudo de Barre *et al.* (2008), no qual os indivíduos diabéticos receberam altas doses de óleo de linhaça (60mg ALA/kg peso/dia) na forma de cápsulas, por três meses, demonstrando maior efetividade das lignanas em reduzir a glicemia do que o óleo da linhaça.

### **2.3. A dieta de cafeteria: um modelo experimental de dieta ocidental obesogênica**

O aumento da ingestão alimentar, o consumo de dietas desequilibradas com elevada densidade energética e a diminuição do gasto energético, associados aos estilos da vida moderna, têm contribuído para a aumento da obesidade (KRANTZ, 1979; PEREIRA *et al.*, 2003). Assim, hábitos alimentares e de atividade física inadequados estão associados com o desequilíbrio do

metabolismo energético. A dieta ocidental é caracterizada por ser de alta densidade energética, rica em carboidratos e gordura, contendo elevados teores de lipídios saturados e pobre em fibra alimentar (POPKIN, 2001).

A denominada dieta de cafeteria tem sido utilizada em pesquisa experimental com o objetivo de aproximar o consumo de animais ao consumo alimentar das sociedades modernas (PEREIRA *et al.*, 2003), uma vez que grande parte das refeições é feita em cafeterias e *fast foods*, caracterizando a "dieta ocidental" (KRANTZ, 1979). Esse modelo experimental vem sendo denominado dieta de cafeteria "ocidentalizada" (PRADA *et al.*, 2005) ou do tipo *fast food*. Neste contexto, animais alimentados com esse tipo de dieta representam um modelo útil para estudos de obesidade humana e da síndrome metabólica (MILAGRO *et al.*, 2006), na medida em que uma alta ingestão de gordura e de açúcares parece ser um fator-chave no rompimento da homeostase metabólica determinante no desenvolvimento da obesidade humana (PEREIRA *et al.*, 2003). Este é um modelo de indução de obesidade exógena, em que é oferecida ao animal uma dieta com alta densidade calórica, por meio de uma sobrecarga de carboidratos ou de gordura, isoladamente ou em associação (CESARETTI; KOHLMANN JUNIOR, 2006). Os componentes da dieta de cafeteria incluem patê, bacon, batata chips, biscoito, chocolate e ração comercial nas proporções 2:1:1:1:1:1 (BERRAONDO *et al.*, 2000; MARGARETO *et al.*, 2000; CAMPION; MARTINEZ, 2004; GARCIA-DIAZ *et al.*, 2009)

Milagro *et al.* (2006) mostraram que animais alimentados com dieta de cafeteria por 56 dias tiveram não só um acúmulo de tecido adiposo, mas também ocorreu um estresse oxidativo no fígado. Garcia-Diaz *et al.* (2009) observaram que ratos *Wistar* alimentados com dieta de cafeteria durante 14 dias tiveram aumento significativo do peso corporal, maior depósito de tecido adiposo branco, hiperfagia e aumento nos níveis séricos de glicose, insulina, triglicerídeos e leptina.

Esse modelo tem sido utilizado para estudar os efeitos metabólicos e nutricionais da dieta ocidental indutora de obesidade. Portanto, esse pode constituir um modelo útil para estudos na área de compostos bioativos dos alimentos, pois é grande a necessidade e o interesse na área de nutrição de identificar alimentos que possam modular positivamente os eventos



fisiopatológicos e auxiliar na retomada da homeostase metabólica, enquanto a população não adote, de vez, uma dieta equilibrada. O conhecimento sobre o efeito coadjuvante de bioativos para evitar complicações metabólicas associadas à obesidade é de extrema importância no mundo atual.

## **2.4. Compostos fitoquímicos**

A linhaça possui vários compostos bioativos benéficos à saúde humana, mas não se pode negligenciar que a semente contém também alguns fatores tóxicos e antinutricionais. Estão presentes na linhaça o inibidor de tripsina (WANASUNDARA *et al.*, 1999), os glicosídeos cianogênicos (HAQUE; BRADBURY, 2002), os compostos antagonistas da vitamina B6 (VARGA e DIOSADY, 1994), o cádmio (LEI *et al.*, 2003; KHAN *et al.*, 2007), o ácido fítico (MARQUES, 2008) e os taninos (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2007).

### **2.4.1. Fitoquímicos antinutrientes**

O ácido fítico na forma hexa e penta-fosfato possui propriedade de quelar minerais divalentes e também de complexar com as proteínas, tornando-os menos biodisponíveis (LARSSON, 1996; MARQUES, 2008).

O tanino é um composto fenólico e ocorre como glicosídeo na forma natural e pode formar complexos com as proteínas, reduzindo sua biodisponibilidade. Taninos podem ser reduzidos pelo processo de extrusão, processo em que o alimento cru é exposto a controladas condições em alta temperatura, pressão e umidade (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2007). Estudos investigaram condições de extrusão (temperatura, pressão, umidade e rotação) na capacidade de inativar os taninos, tendo mostrado 61% de redução quando a linhaça passou por extrusão a alta temperatura (80°C), com velocidade de rotação de 96,8 rpm e umidade de 40% (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2007).

### **2.4.2. Fitoquímicos tóxicos da linhaça**

O cádmio e os glicosídeos cianogênicos são potencialmente tóxicos ao organismo. O cádmio é um metal pesado que quando se acumula nos rins pode causar disfunção renal, além de enfisema pulmonar (LEI *et al.*, 2003), aminoacidúria, glicosúria, fosfatúria e ainda comprometimento da reabsorção de minerais, predispondo o organismo à osteomalácia (WHO, 2006). Em um

estudo, em que se observou o aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer de mama em filhotes de ratas que consumiram 10% de linhaça durante a gestação e a lactação, os autores atribuíram esses efeitos aos níveis tóxicos de cádmio e de lignanas que possuem efeitos endócrinos, ambos presentes na linhaça (KHAN *et al.*, 2007). Está estabelecido que a ingestão de cádmio não deve ultrapassar 1 µg/kg/dia (WHO, 2006), sendo que a semente de linhaça contém cerca de 0,526 µg de cádmio por kg de semente (LEI *et al.*, 2003). Os níveis de ingestão de linhaça descritos na literatura giram em torno de 40g/ dia, o que resultaria em 0,021 µg de cádmio/dia aproximadamente. Esses valores, se ingeridos na alimentação humana, não apresentam risco de toxicidade ligada ao cádmio.

Os glicosídeos cianogênicos são metabólitos secundários das plantas (VETTER, 2000). Estão presentes na linhaça, principalmente, sob a forma de linustatina, neolinustatina e limarina (CUNNANE *et al.*, 1993; HAQUE; BRADBURY, 2002). A cianogênese é a capacidade de produzir ácido cianídrico, e a quantidade produzida varia entre as espécies vegetais (VETTER, 2000), sendo que a ingestão de 200 mg de ácido cianídrico pode ser letal ao organismo humano adulto (CONN, 1969). Mais de 2500 espécies de plantas acumulam esses compostos (VETTER, 2000), como, por exemplo, mandioca, sorgo, linhaça, bambu, maçã, pera, abricó, ameixa e nectarina (HAQUE; BRADBURY, 2002). A média tolerável de ingestão é de 12 µg cianeto/kg peso corporal (WHO, 1996). O cianeto ou ácido cianídrico pode diminuir os níveis da vitamina B12 no organismo e exacerbar sua deficiência. Também está relacionado à elevada incidência do cretinismo. Os efeitos crônicos da ingestão dos compostos cianogênicos se manifestam no sistema nervoso e são observados em populações que ingerem altos níveis de cianeto na alimentação (WHO, 1996). A ingestão dos glicosídeos cianogênicos pode aumentar os níveis sanguíneos desses compostos e de seus metabólitos ao consumir linhaça crua. Entretanto, esses compostos podem ser eliminados no cozimento. Cunnane *et al.* (1993) demonstraram aumento da quantidade de tiocianato normalizado pela creatinina na urina, quando os indivíduos consumiram 50 g de linhaça crua. Ao administrar a mesma quantidade de farinha de linhaça como ingrediente de pães, esse metabólito não foi encontrado na urina.

Oomah e Mazza (1998) mostraram, em semente de linhaça, a faixa de concentração de 264–354 mg de compostos cianogênicos por 100 g, sendo 10–1,8 mg de linamarina, 136–162 mg de linustatina e 105-183 mg de neolinustatina. Esse estudo descreveu o processamento industrial da semente para produzir o óleo, passando por linhaça em flocos e extração de gordura com prensa e com solvente, até chegar ao óleo da linhaça e farinha desengordurada. Durante esse processamento, ocorrem alterações do conteúdo de cianogênicos totais, as proporções de glicosídeos cianogênicos variaram sugerindo instabilidade desses compostos. Após processar a semente para a forma de flocos, observaram redução do conteúdo total destes compostos, provavelmente causada pela diminuição do ácido cianídrico ao ocorrer destruição da integridade celular. Essa redução foi em 9% do conteúdo de glicosídeos durante todo o processo, quando expresso em base livre de gordura. Varga *et al.* (1994) também observaram redução dos compostos cianogênicos após extração dos lipídios da linhaça. Porém, após separar a casca da linhaça, foi observado aumento significativo do conteúdo de compostos cianogênicos na fração cotiledônea (OOMAH; MAZZA, 1997).

Yang *et al.* (2004) testaram vários métodos de processamento na tentativa de diminuir a quantidade dos compostos cianogênicos da linhaça. O processamento em micro-ondas reduziu os compostos cianogênicos da linhaça em 82%, a autoclavagem reduziu em 27% e extração de solvente por uma, duas ou três vezes teve a redução de 52, 80 e 89%, respectivamente. Ao submeter a linhaça à fervura, ocorreu redução de 100% dos compostos cianogênicos iniciais. Esse estudo mostrou a eficiência do calor em inativar os compostos glicosídicos cianogênicos.

Cunnane *et al.* (1993) também encontraram eficiência das altas temperaturas em inativar os glicosídeos cianogênicos ao analisar *muffin* feito com 25 g de farinha de linhaça (230°C por 15 a 18 minutos), não tendo sido detectados glicosídeos cianogênicos.

A média tolerável de ingestão para um indivíduo de 60 kg seria aproximadamente 0,72 mg de acordo com Who (1996). A ingestão média de linhaça indicada na literatura (40g) fornece 141,5 mg de compostos cianogênicos. Portanto, o consumo crônico da linhaça pode levar ao risco de intoxicação. Entretanto, deve ser enfatizado que esses compostos são voláteis

e termossensíveis. Os processamentos mecânicos e térmicos da linhaça inativam grande parte desses compostos ao destruir a integridade celular (OOMAH; MAZZA, 1998). Por outro lado, a linhaça consumida integralmente na forma de semente tem sua biodisponibilidade reduzida devido à dificuldade em se digerir a semente. Logo, apesar do alto conteúdo de compostos cianogênicos da linhaça, são necessários estudos tanto da biodisponibilidade destes compostos *in vivo*, quanto da linhaça processada ou intacta, para que o consumo diário da linhaça possa ser recomendado sem riscos à saúde humana.

Além de eliminar os compostos cianogênicos, o tratamento térmico também mostrou efeito sobre a digestibilidade de proteínas no estudo de Jacinto (2007). Este estudo incluiu experimentos *in vitro* e *in vivo*, em que as globulinas da farinha de linhaça crua apresentaram baixa susceptibilidade à digestão *in vitro* por tripsina e quimotripsina e maior degradação pela pancreatina. O aquecimento das globulinas por cinco e 15 minutos a 100 °C aumentou consideravelmente a digestibilidade pela tripsina e pancreatina. No experimento de digestibilidade *in vivo*, a globulina apresentou alta susceptibilidade à degradação de 93% pelas enzimas digestivas. Na avaliação da fração albumina, esta apresentou alta atividade inibitória de tripsina (100%) e inibição de quimotripsina (28%), não sendo detectada atividade lectínica. Os animais alimentados com a farinha de linhaça crua apresentaram ganho de peso 73% inferior ao grupo padrão e redução de 35% no crescimento das vilosidades intestinais. Esses resultados foram considerados indicativos da ação negativa dos inibidores de tripsina no crescimento dos animais.

Dessa forma, o tratamento térmico pode ser utilizado para diminuir a concentração de compostos cianogênicos e inibidores de tripsina, uma vez que estudos prévios demonstraram que há estabilidade dos ácidos graxos da linhaça durante o processamento térmico e mecânico para a obtenção da farinha. O processamento térmico, utilizando calor seco, em tempo e temperatura adequados, preservou os ácidos graxos, os quais apresentam ação funcional à saúde (MARQUES, 2008; MORAES *et al.*, 2008).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Investigar os efeitos da ingestão de farinha integral de linhaça, crua e submetida ao tratamento térmico, sobre fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis e parâmetros de toxicidade, em ratos adultos.

#### **3.2. Específicos**

- ✓ Caracterizar a composição química da farinha de linhaça;
- ✓ Avaliar o consumo alimentar e parâmetros biométricos;
- ✓ Analisar parâmetros bioquímicos séricos;
- ✓ Avaliar a peroxidação lipídica no soro e em homogenados de fígado e de testículo; e
- ✓ Mensurar a deposição de gordura no tecido hepático.

## **4. METODOLOGIA GERAL**

### **4.1. Local de Estudo**

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Desenvolvimento de Novos Produtos e Análise Sensorial, Nutrição Experimental, Análise de Alimentos e Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição e Saúde; no Laboratório de Biologia Estrutural, do Departamento de Biologia Geral; e no Laboratório de Biologia de Peixes, do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

### **4.2. Matéria-prima**

Para o experimento foram utilizadas sementes de linhaça (*Linum usitatissimum*) da variedade marrom, adquiridas no comércio local da cidade de Viçosa, MG (Brasil). As sementes “*in natura*” foram acondicionadas em embalagens de polipropileno até o seu processamento.

### **4.3. Elaboração da farinha de linhaça**

Para a obtenção das farinhas, uma parte das sementes foi submetida a tratamento térmico a 150° C em estufa, por 15 min. As sementes cruas e as submetidas ao tratamento térmico foram posteriormente trituradas em multiprocessador, acondicionadas em embalagens de polipropileno e armazenadas em temperatura ambiente. As condições de processamento utilizadas foram pré-estabelecidas anteriormente e asseguraram a preservação do ácido linolênico e a estabilidade oxidativa da farinha (CARRARO *et al.*, 2009; CARRARO *et al.*, 2009).

### **4.4. Análise da composição química centesimal da farinha de linhaça**

O teor de umidade foi determinado em estufa de circulação e renovação de ar (Marconi®, modelo MA 035) a 105°C, durante 24 horas, até peso constante (AOAC, 1998).

O teor de proteínas foi determinado segundo o método de semimicro Kjeldahl, para a quantificação de nitrogênio total (AOAC, 1998). No cálculo da conversão de nitrogênio em proteínas, foi utilizada a constante 6,25.

Os lipídios totais foram determinados pelo método de extração, utilizando-se extrator de Soxhlet (AOAC, 1998).

O conteúdo de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 550°C (AOAC, 1998).

O teor de fibra alimentar total da farinha de linhaça foi determinado pelo método enzimático-gravimétrico (AOAC, 1998), utilizando-se kit enzimático da marca Sigma®. Esse método está fundamentado na porção não-hidrolisada do alimento que resiste à digestão enzimática sequencial com  $\alpha$ -amilase, protease e amiloglicosidase. O teor de carboidratos foi estimado por meio do cálculo da diferença entre 100 e a soma do conteúdo de proteínas, gorduras, fibra alimentar, umidade e cinzas. Este procedimento está previsto pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 360, de 23 de dezembro de 2003 (BRASIL, 2003).

O conteúdo calórico da farinha de linhaça foi calculado de acordo com a composição do alimento em proteínas, lipídios e carboidratos, sendo utilizados os fatores de conversão 4, 9 e 4 Kcal/g dos macronutrientes, respectivamente (MAHAN; ESCOTT-STUSMP, 2002).

#### **4.5. Animais e dietas experimentais**

Foram utilizados 60 ratos machos adultos do tipo *Ratus norvegicus albinus*, Mammalia, da linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram adquiridos recém-desmamados, sendo mantidos em gaiolas individuais em ambiente climatizado e recebendo dieta comercial até alcançarem a fase adulta (75 dias de idade), quando atingiram peso corporal entre 150 a 200g. No período experimental, os animais também foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura controlada em  $22 \pm 2^\circ$  C, fotoperíodo de 12 horas, recebendo diariamente dieta e água destilada *ad libitum*. Foram constituídos seis grupos com 10 animais cada, recebendo dietas experimentais, Tabela 1, por um período de 57 dias, seguindo o modelo do estudo de Milagro *et al.* (2006). As quantidades de ingredientes foram ajustadas para obter dietas isocalóricas entre o grupo de dieta equilibrada.

Tabela 1: Composição das dietas experimentais (g/100g de mistura).

<b>Ingredientes</b>	<b>AIN-93M</b>	<b>FLTT</b>	<b>FLsTT</b>	<b>CAF</b>	<b>CAFL</b>	<b>Comercial</b>
Caseína (82% proteína) (Rhoster®)	14,00	10,89	10,89	0	0	0
Sacarose (União® refinada)	10,00	10,00	10,00	0	0	0
Amido de Milho (Anchieta®)	46,50	44,18	44,18	0	0	0
Amido Dextrinizado (Cor Products®)	15,50	15,50	15,50	0	0	0
Óleo de Soja (Soya®)	4,00	0,00	0,00	0	0	0
Celulose Microfina (Rhoster®)	5,00	2,50	2,50	0	0	0
Mistura Mineral AIN93M (Rhoster®)	3,50	3,50	3,50	0	0	0
Mistura Vitamínica AIN93M (Rhoster®)	1,00	1,00	1,00	0	0	0
L-cistina (Rhoster®)	0,18	0,18	0,18	0	0	0
Bitartarato de Colina (Rhoster®)	0,25	0,25	0,25	0	0	0
Farinha de linhaça	0	12,00	12,00	0	12,57	0
Patê de fígado	0	0	0	14,28	12,57	0
Biscoito tipo Maria (Aymore®)	0	0	0	14,28	12,57	0
Batata frita “palha” (Quezinha®)	0	0	0	14,28	12,57	0
Chocolate ao Leite (Garoto®)	0	0	0	14,28	12,57	0
Bacon	0	0	0	14,28	12,57	0
Ração comercial (Labcil®)	0	0	0	28,57	25,14	100,00

\* AIN-93M =controle; FLTT = dieta AIN-93M com 50% do teor de fibras alimentares proveniente da fibra da farinha de linhaça submetida ao tratamento térmico (TT); FLsTT: dieta AIN 93- M com 50% do teor de fibras alimentares proveniente da fibra da farinha de linhaça sem TT; CAF: dieta de cafeteria controle; CAFL= dieta de cafeteria + farinha de linhaça –TT a 12,5%, o que equivale à proporção de 1/8 dos ingredientes totais da dieta; Comercial = ração comercial.



As dietas foram elaboradas semanalmente e mantidas em freezer convencional (-24°C).

Semanalmente, foram coletadas amostras da dieta para análise da composição centesimal feita conforme metodologia descrita para a análise da composição da farinha de linhaça descrita no item 4.3. O teor total de fibras alimentares da dieta de cafeteria e cafeteria adicionada de linhaça foi estimado a partir de cálculo, utilizando as informações descritas na rotulagem dos produtos.

#### **4.6. Desenho experimental**

Foi realizado um estudo experimental controlado com duração de 57 dias para análises de parâmetros *in vivo* e *ex-vivo*. O desenho do estudo está ilustrado na Figura 1.

Os efeitos da adição das farinhas de linhaça crua e submetida ao tratamento térmico para modular parâmetros fisiológicos de animais alimentados com dieta equilibrada foram avaliados em três grupos de animais, os quais receberam as seguintes dietas peletizadas: i) AIN-93M (REEVES *et al.*, 1993), considerada controle; ii) FLTT: AIN-93M com substituição de 50% de celulose por fibra de farinha de linhaça, submetida ao tratamento térmico – TT e iii) FLsTT: AIN- 93M com substituição de 50% de celulose por fibra de farinha de linhaça, sem TT.

Os efeitos da adição de farinha de linhaça (TT) para modular parâmetros fisiológicos de animais alimentados com dieta obesogênica foram avaliados em dois grupos de animais, os quais receberam as seguintes dietas peletizadas: i) CAF: dieta de cafeteria, considerada como controle; e ii) CAFL: dieta de cafeteria com adição de farinha de linhaça submetida ao TT a 12,57%, o que equivale à proporção de 1/8 dos ingredientes totais da dieta. Foram considerados, para efeito de comparação, dois grupos de animais: os que receberam a dieta AIN-93M (dieta equilibrada) e os que receberam ração comercial (padrão histológico considerado normal para animal roedor).

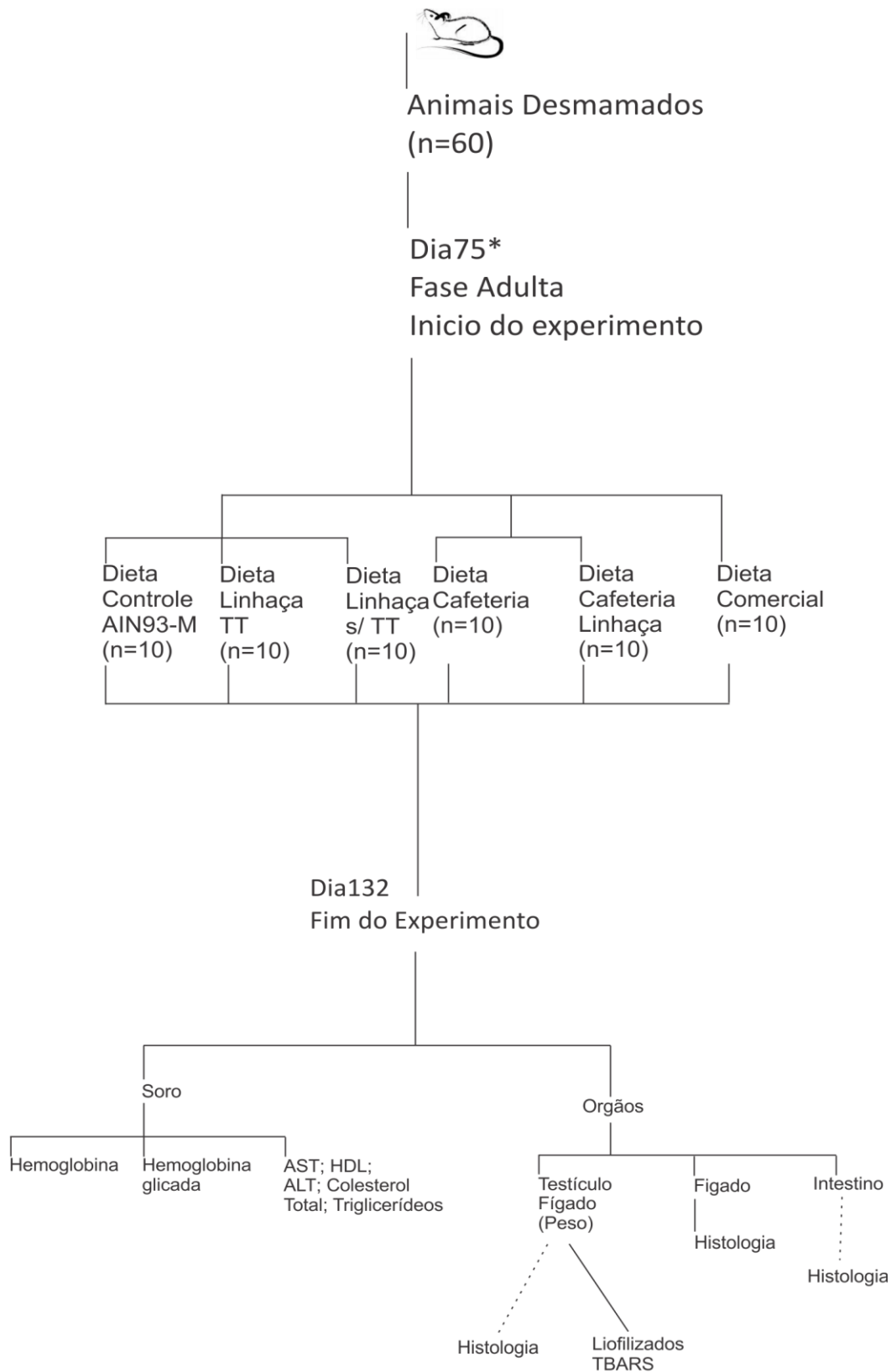


Figura 1 – Desenho experimental

## **4.7. Coleta de amostras biológicas**

### **4.7.1. *In vivo***

As fezes foram coletadas na primeira, quinta e oitava semanas. Foram acondicionadas em freezer convencional (-24°C) e posteriormente submetidas à secagem, trituração e aferição dos pesos.

### **4.7.2. *Ex-vivo***

Ao final do experimento, os animais foram colocados em jejum por 12 horas, anestesiados com éter e submetidos à eutanásia por exsanguinação. O sangue foi coletado parte em tubos com EDTA para determinação da hemoglobina no mesmo dia da coleta, e parte restante do foi centrifugado a 1.000 x g, por 15 minutos, para obtenção do soro, que foi armazenado à temperatura de - 20°C (para amostras bioquímicas séricas) e - 80°C (análise de peroxidação). Foram excisados os seguintes órgãos: fígado, intestino e testículo. Parte do material biológico foi mantido em nitrogênio líquido e liofilizado para posteriores análises bioquímicas, e outra parte foi fixada em líquido de Bouin para estudos histológicos. Foi aferido o peso dos fígados e dos testículos e calculados os índices hepatossomático e gonadossomático.

## **4.8. Parâmetros avaliados**

### **4.8.1. *Consumo alimentar e variação de peso corporal***

O consumo alimentar foi avaliado por meio do registro diário de ingestão alimentar pelos animais (variação entre a oferta e as sobras da dieta deixadas nas gaiolas).

A variação do peso corporal foi avaliada por meio de pesagem semanal dos animais durante os 57 dias de experimento.

### **4.8.2. *Coeficiente de eficiência alimentar (CEA)***

A ingestão alimentar, a sobra da dieta e o peso corporal individual foram verificados semanalmente. Para a determinação do CEA, utilizou-se a seguinte fórmula:

CEA = ganho de peso do animal (g)/ consumo da dieta experimental (g)

#### **4.8.3. Teor de lipídios nas fezes**

Os teores de umidade e de lipídios totais foram determinados nas amostras de fezes, conforme metodologia descrita anteriormente no item 4.4. Os resultados foram expressos em %.

#### **4.8.4. Parâmetros bioquímicos séricos**

O colesterol total, fração HDL-colesterol, triglicerídeos foram determinados por meio do método enzimático colorimétrico, utilizando-se *kits* comerciais Human do Brasil®, com utilização de procedimentos descritos no protocolo do fabricante. Após as reações, a leitura de absorvância foi feita em espectrofotômetro (Shimadzu®, modelo UV – 1601), em 500 nm. A concentração foi expressa em mg/dL. A razão HDL/Colesterol foi calculada

A hemoglobina total foi determinada por método enzimático colorimétrico, utilizando-se *kit* comercial (Hemoglobina - Bioclin®). Para a análise, foram seguidas as orientações descritas no protocolo do fabricante. Após as reações, a absorvância foi lida em espectrofotômetro, em 540 nm. A concentração da hemoglobina total foi expressa em g/dL.

A hemoglobina glicada foi determinada por método de troca iônica, utilizando-se *kit* comercial (*Glycohemoglobin HbA<sub>1c</sub>-test* – Human do Brasil®). Para a análise, foram seguidas as orientações descritas no protocolo do fabricante. Após as reações, a leitura de absorvância foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu®, modelo UV – 1601) em 415 nm. A concentração de HbA<sub>1c</sub> foi expressa em % de Hb total.

Para a determinação das atividades das aminotransferases, foi empregado o método cinético UV, utilizando-se *kits* comerciais (Human do Brasil®). Para a análise, foram seguidas as orientações recomendadas pelo fabricante. A absorvância foi lida em 365 nm, utilizando-se espectrofotômetro (Shimadzu®, modelo UV – 1601). A atividade das aminotransferases foram expressas em unidades internacionais por litro (UI/L).

#### **4.8.5. Peroxidação lipídica**

A peroxidação lipídica foi estimada no soro e em homogenados de tecido liofilizado do fígado e testículo, por meio do Teste de Substâncias

Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com metodologia descrita por Buege e Aust (1978).

Para obtenção dos homogenados, os tecidos liofilizados foram ressuspensos em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, na proporção 1:10 (m/v).

Alíquotas de 0,5 mL do soro e dos homogenados dos tecidos foram adicionadas a tubos contendo solução de TBARS constituída de 15% de ácido tricloroacético e 0,375% ácido tiobarbitúrico dissolvidos em HCL 0,25N. A mistura da reação permaneceu em banho-maria 90°C por 15 mim. Após a incubação, a mistura foi resfriada e centrifugada a 1000 x g. O sobrenadante foi utilizado para leitura de absorvância em 535nm em espectrofotômetro (Shimadzu®, modelo UV – 1601). Os resultados foram expressos em nmol de equivalentes de malondiadeído-MDA por miligrama de proteína nas amostras de homogenados e em nmol/mL nas amostras de soro, utilizando-se o coeficiente de extinção molar =  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (BUEGE; AUST, 1978).

#### **4.8.6. Concentração de proteínas totais nos homogenados**

Para a determinação de proteínas totais nos homogenados de tecidos, foi empregado o método de biureto, utilizando-se *kit* comercial (Proteínas Totais - Bioclin®). Para a análise, foram seguidas as orientações recomendadas pelo fabricante. A leitura de absorvância foi realizada em 545 nm, utilizando-se espectrofotômetro (Shimadzu®, modelo UV – 1601). A concentração de proteína foi expressa em g/dL.

#### **4.8.7. Índices hepatossomático- IHS e gonadossomático-IGS**

Após excisão, o peso dos fígados e dos testículos dos animais foram registrados e utilizados para calcular os índices hepatossomático e gonadossomático, que representam as relações entre os pesos dos órgãos e o peso do animal vivo em jejum de 12 horas, sendo:

IHS = PF/PC x 100, onde: IHS = índice hepatossomático

PF = g peso fígado

PC = g peso corporal

IGS = PT/PC x 100, onde: IGS = índice gonadossomático

PT = g peso testículo

PC = g peso corporal

#### **4.8.8. Medição das gotas de gordura no tecido hepático**

Fragmentos do fígado foram coletados de seis animais dos grupos experimentais CAF, CAFL e Comercial, fixados em líquido de Bouin por um período mínimo de 24 horas, após o que foram transferidos para solução de álcool 70% e preservados até processamento. Em seguida, os fragmentos foram transferidos para solução de álcool 95% por quatro horas, após o que foram imersos em solução de álcool 95% e resina glicolmetacrilato (Leica, Historesin<sup>®</sup>) na proporção de 1:1 por 12 horas, seguida de resina pura por 24 horas, e posterior inclusão. Foram obtidos cortes histológicos semisseriados com 3 µm de espessura em micrótomo automático (Reichert-Jung<sup>®</sup>), utilizando-se navalha de vidro, e submetidos à coloração pela técnica Hematoxilina/Eosina. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck<sup>®</sup>), analisadas em microscópio de luz CX31 Olympus, e as imagens foram obtidas em câmera digital SC 020 por meio do software Analysis GETIT, Olympus, para posterior visualização e quantificação de prováveis áreas de esteatose.

As áreas de gordura no tecido hepático foram determinadas utilizando-se quantificação computacional das gotas de gordura, e os valores foram obtidos por meio da aplicação de algoritmo desenvolvido na linguagem de programação Open Source SciLab, versão 4.1 (INRIA, ENPC, 2006). Utilizou-se o princípio de limiarização, que consiste em separar regiões de uma imagem quando ela apresenta duas classes (o fundo e o objeto), produzindo uma imagem binária. Esta fase consiste na partição do histograma, convertendo os pixels cujo tom de cinza é maior ou igual ao limiar em branco, e os demais em preto. Foi criada uma imagem padrão de matriz com tamanho igual àquele das imagens a serem analisadas. A área total real foi calculada para cada imagem analisada. Assim, nas imagens binárias, as gotas de gordura foram representadas por *pixels* de valor unitário, e todos os demais constituintes da imagem foram representados por pixels de valor zero (ROCHA *et al.*, 2008).

#### **4.9. Estatística**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e dez repetições. Os dados foram analisados usando ANOVA, e os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Diferença significativa entre grupos foi detectada pelo teste de Duncan, utilizando programa SAEG-UFV 9.1 para análises de dados. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para analisar a deposição de gordura hepática, utilizando o programa Sigma STAT, versão 2.03. O nível de significância adotado foi de 5%.

#### **4.10. Aspectos éticos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA-UFMG), processo 214/2009, e foi conduzido em conformidade com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (CETEA/UFMG).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### 5.1. Caracterização da farinha integral de linhaça quanto à composição química

A composição química centesimal da farinha integral da linhaça, de granulometria *de 20 meshes*, foi determinada para fornecer subsídios para o ajuste da quantidade de ingredientes durante o preparo das dietas isocalóricas utilizadas nos ensaios biológicos (Tabela 2). Variações nas concentrações dos nutrientes entre as farinhas crua e tratada termicamente ocorreram, em consequência da redução de umidade de 7,3 para 1,72%.

De maneira geral, a composição centesimal da farinha de linhaça utilizada no presente estudo foi semelhante à descrita na literatura para a semente de linhaça, com teores de fibra alimentar variando de 24 a 33%, teor de proteína variando de 17 a 20%, teor de lipídios de 37 a 42%, carboidrato (incluindo fibras alimentares) de 25 a 36% e umidade e cinzas em torno de 4 e 7%, respectivamente (PELLIZZON *et al.*, 2007; MARQUES, 2008; BASSETT *et al.*, 2009). Composição química similar foi também descrita para a farinha integral de linhaça (CINTRA *et al.*, 2006; BASSETT *et al.*, 2009).

Em estudo sobre a composição da semente de linhaça do mesmo lote utilizado no presente trabalho, desenvolvido concomitantemente no Departamento de Nutrição e Saúde, verificou-se que o teor de ácido linolênico da farinha foi de aproximadamente 7,5g/100 g de farinha de linhaça, conteúdo de fenólicos totais de 537,2 mg de equivalentes de ácido gálico/100g e o teor de vitamina E de 8,6 mg/100 g (CARRARO, 2009).



Tabela 2: Composição química centesimal da farinha integral de linhaça crua.

	g/100g de farinha
<b>Umidade</b>	7,3
<b>Proteínas</b>	24,2
<b>Lipídios</b>	41,3
<b>Carboidratos*</b>	4,3
<b>Fibra alimentar total</b>	19,6
<b>Cinzas</b>	3,24
<b>Densidade calórica (kcal/g)</b>	4,86

\*Não estão incluídas fibras alimentares.

## 5.2. Composição química centesimal das dietas experimentais

Apesar de as dietas AIN-93M, FL TT e FL s/TT terem sido formuladas para obter dietas isocalóricas, os resultados da análise de composição química centesimal demonstraram diferenças entre os teores de macronutrientes, especialmente para lipídios (Tabela 3), o que pode ser atribuído a problemas de homogeneização das amostras e dietas.

A dieta CAF apresentou densidade calórica 39,6% mais elevada, contendo 12 vezes mais gordura e 2,7 vezes menos fibra alimentar do que a dieta AIN-93M (Tabela 3). A dieta de cafeteria é caracterizada por apresentar alta densidade energética, elevado teor de carboidratos simples e de gordura e baixo teor de fibra alimentar (POPKIN, 2001). A dieta CAF L apresentou teores de fibra alimentar 4,2 vezes maiores do que a dieta CAF, sendo que esse valor foi próximo ao da dieta AIN-93M, que é a recomendação para roedores segundo Reeves *et al.* (1993).

Tabela 3: Composição química centesimal das dietas (g/100g).

	<b>AIN-93M</b>	<b>FLTT</b>	<b>FLsTT</b>	<b>CAF</b>	<b>CAFL</b>	<b>COMERCIAL</b>
<b>Umidade</b>	32,20	21,80	22,72	23,25	21,81	32,22
<b>Lipídios Totais</b>	2,25	0,88	0,77	27,19	28,29	0,76
<b>Proteínas</b>	9,52	9,30	9,56	13,52	13,96	14,72
<b>Fibra alimentar</b>	5,00	5,00	5,00	1,87*	7,81*	8,00*
<b>Cinzas</b>	1,87	2,13	2,13	3,35	3,19	5,34
<b>Carboidratos</b>	49,16	60,89	59,82	30,82	24,94	38,96
<b>Densidade</b>	254,97	288,68	284,45	422,07	410,21	221,56
<b>Calórica (kcal/g)**</b>						

AIN-93M = controle; FLTT = dieta AIN-93M com 50% do teor de fibras alimentares proveniente da fibra da farinha de linhaça submetida ao tratamento térmico (TT); FLsTT (dieta AIN-93M com 50% do teor de fibras alimentares proveniente da fibra da farinha de linhaça sem TT); CAF= dieta de cafeteria; CAFL = dieta de cafeteria + 12,5% de farinha de linhaça com TT; Comercial = ração comercial.

\*Considerando teor descrito na informação nutricional contida na embalagem.

\*\*Calculados com base na informação nutricional contida na embalagem dos ingredientes.

### **5.3. Efeitos da ingestão da farinha de linhaça sobre parâmetros fisiológicos de ratos alimentados com dieta AIN-93M**

#### **5.3.1. Ganho de peso corporal, consumo alimentar, coeficiente de eficiência alimentar e índices hepatossomático e gonadossomático**

Houve diferença no consumo alimentar entre os grupos experimentais (Tabela 4). O consumo de dieta pelos animais alimentados com FLsTT foi significativamente menor que o consumo dos demais grupos, que não diferiram entre si. O consumo do grupo FLsTT foi de 5,8 % e 1,3% menor que o grupo AIN-93M e FLTT, respectivamente. Apesar de o efeito da farinha de linhaça crua reduzir a ingestão alimentar dos animais, isso não interferiu significativamente no ganho de peso corporal e no coeficiente de eficiência alimentar. Não houve diferença no CEA entre os grupos, e esse resultado confirmou que as dietas eram isocalóricas.

O efeito da dieta FLsTT em reduzir o consumo alimentar dos animais não foi demonstrado no estudo de Marques (2008), que incluiu farinhas de linhaça crua ou assada (180°C, por 40 min.) ao nível de 16%, às dietas AIN 93-G de ratos *Wistar*, por 21 dias. Porém, apesar da adição de maiores níveis de linhaça, o tempo do estudo foi inferior ao utilizado no presente trabalho, e os animais ainda se encontravam em fase de crescimento. De maneira similar aos resultados do nosso estudo, Marques (2008) também não observou efeito da linhaça no ganho de peso dos animais.

O tratamento térmico da farinha não interferiu no IHS, uma vez que não houve diferença nesse parâmetro entre os dois grupos tratados com linhaça. Mas o grupo FLsTT apresentou essa razão 13% menor que o grupo AIN- 93M. Não houve diferença no IHS entre os grupos AIN-93M e FLTT. No estudo de Marques (2008), com farinha de linhaça crua e tratada termicamente, houve redução do peso do fígado em relação ao controle AIN-93G. Os autores justificaram essa redução à ingestão de ALA, que levaria a uma maior secreção de colesterol na bile, conduzindo à depleção do *pool* intra-hepático de colesterol, conseqüentemente, aumentando a síntese e o *turnover* de colesterol. Além disso, sugeriram que o ALA reduziria o acúmulo hepático de

lipídios por estimular a betaoxidação, inibindo a síntese de ácidos graxos e de triacilgliceróis, concordando com os resultados relatados por Vijaimohan *et al.* (2006).

Não houve diferença entre o IGS dos animais no presente experimento. O IGS pode ser interpretado como uma medida indireta da eficiência gonádica, uma vez que a produção espermática é altamente correlacionada com a massa testicular (RUSSELL *et al.*, 1995), podendo ser também um parâmetro de toxicidade de xenobióticos e um indicador quantitativo da produção espermática (ARAÚJO, 2008). A modulação hormonal por linhaça foi demonstrada no estudo de Demark-Wahnefried *et al.* (2001), com redução do nível de testosterona em homens com câncer de próstata, suplementados com 30 g de linhaça em dietas com 20% de redução de energia. Apesar dessas evidências anteriores, os resultados do presente estudo mostraram que as farinhas de linhaça, crua ou tratada termicamente, adicionadas a uma dieta equilibrada, em nível de 12%, não causaram alterações no IGS em animais machos adultos em fase reprodutiva. Contudo, apesar de não terem sido observadas diferenças significativas nesse índice, futuros estudos de histologia testicular poderão confirmar se a proporção de tecido intersticial/ parênquima se mostrou alterada, o que poderia indicar comprometimento da produção espermática.

Tabela 4. Consumo alimentar total, ganho de peso corporal total, coeficiente de eficiência alimentar (CEA), índice hepatossomático (IHS) e índice gonadossomático (IGS) de ratos *Wistar* alimentados com as dietas experimentais.

	AIN-93M	FLTT	FLsTT
<b>Consumo total</b>	1938,66 ± 113,67 a	1914,02 ± 74,84 a	1824,42 ± 44,49 b
<b>Ganho de peso</b>	151,00 ± 31,74 a	141,10 ± 32,45 a	145,89 ± 41,22 a
<b>CEA*</b>	0,078 ± 0,02 a	0,075 ± 0,02 a	0,079 ± 0,02 a
<b>IHS **</b>	3,45 ± 0,36 b	3,09 ± 0,42 ab	2,99 ± 0,32 a
<b>IGS ***</b>	0,49 ± 0,05 a	0,50 ± 0,75 a	0,52 ± 0,49 a

Valores expressos como médias ± DP (n= 10). Médias, na mesma coluna, identificadas com letras diferentes, são estatisticamente diferentes (Teste Duncan, p < 0,05).

\* = CEA (coeficiente de eficiência alimentar) = ganho de peso do animal (g) / consumo da dieta (g)

\*\* IHS = PF/PC x 100, onde: IHS = índice hepatossomático; PF = g peso fígado; PC = g peso corporal

\*\*\* IGS = PT/PC x 100, onde: IGS = índice gonadossomático; PT = g peso testículo; PC = g peso corporal

AIN-93M = controle; FLTT = dieta AIN-93M com 50% do teor de fibras alimentares proveniente da fibra da farinha de linhaça submetida ao tratamento térmico (TT); e FLsTT dieta AIN-93M com 50% do teor de fibras alimentares proveniente da fibra da farinha de linhaça sem TT.

### 5.3.2. Perfil lipídico sérico e teor de lipídios nas fezes

Na tabela 5 estão apresentadas as concentrações séricas de colesterol total, HDL, triacilglicerol, razão colesterol total/HDL e a concentração de lipídios totais nas fezes nos animais.

Os animais que receberam as dietas FLTT e FLsTT não diferiram entre si e apresentaram colesterolemias estatisticamente menores que o grupo AIN-93M. As concentrações de colesterol sérico dos grupos FLTT e FLsTT foram, respectivamente, 17,70 e 18,14% menores do que a colesterolemia do grupo controle.

A concentração sérica de HDL e a razão CT/HDL não diferiram entres os grupos experimentais. O risco cardiovascular em seres humanos aumenta com altos níveis de LDL ou com baixos níveis de HDL e, assim, a razão entre eles é um indicador de risco determinado pelos níveis de ambas as lipoproteínas (IV DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007). Quanto maior o valor numérico da relação, maior o risco cardiovascular. Nesse estudo, a razão CT/HDL não diferiu entres os grupos, apesar da redução significativa da colesterolemia. Esse resultado pode ser entendido pela redução, em paralelo, das médias de concentração de HDL, apesar de o

decréscimo não ter sido estatisticamente significativo.

A concentração sérica de triacilglicerol apresentou o mesmo perfil de resposta que o colesterol, sendo estatisticamente menor nos grupos FLTT e FLsTT em comparação com o grupo AIN-93M. OS grupos FLTT e FLsTT não diferiram entre si. Os valores de trigliceridemia dos grupos FLTT e FLsTT foram, respectivamente, 36,90 e 39,67% menores que os do grupo AIN-93M.

O efeito da linhaça em diminuir colesterol e triacilgliceróis séricos, observado no presente estudo, também foi demonstrado por outros autores, tanto em animais (PRASAD, 1997; PRASAD *et al.*, 1998; PRASAD, 2005; CINTRA *et al.*, 2006; DUPASQUIER *et al.*, 2006; MEDEIROS *et al.*, 2007; PELLIZZON *et al.*, 2007; NEWAIRY; ABDU, 2009), quanto em seres humanos (CUNNANE *et al.*, 1993; RALLIDIS *et al.*, 2003; DODIN *et al.*, 2005; PRASAD, 2005; PAN *et al.*, 2007)

A excreção de lipídios nas fezes dos grupos FLTT e FLsT não diferiu entre si e foi estatisticamente mais elevada em comparação com o grupo controle. O conteúdo de lipídios nas fezes apresentado pelos grupos FLTT e FLsTT foi, respectivamente, 135 % e 128% mais elevado que o grupo AIN-93M (controle).

Tabela 5. Concentrações séricas de colesterol total (CT), triacilglicerol (TG), lipoproteína de alta densidade (HDL) e teor de lipídios nas fezes de ratos *Wistar* alimentados com as dietas experimentais

	AIN-93M	FLTT	FLsTT
<b>CT(mg/dL)</b>	128,21 ± 24,49 a	105,51 ± 15,58 b	104,95 ± 10,45 b
<b>HDL (mg/dL)</b>	47,44 ± 8,35 a	41,85 ± 6,09 a	41,65 ± 6,62 a
<b>TG (mg/dL)</b>	215,22 ± 40,74 a	135,91 ± 41,65 b	129,86 ± 32,47 b
<b>CT/ HDL</b>	2,72 ± 0,37 a	2,53 ± 0,26 a	2,51 ± 0,28 a
<b>Lipídios nas fezes (%)</b>	3,09 ± 0,549 b	7,26 ± 0,567 a	7,03 ± 2,305 a

Valores expressos como médias ± DP (n= 10).

Médias, na mesma coluna, identificadas com letras diferentes, são estatisticamente diferentes (Teste Duncan, p < 0,05).

AIN-93M = controle; FLTT = dieta AIN-93M com 50% do teor de fibras alimentares proveniente da fibra da farinha de linhaça submetida ao tratamento térmico (TT); e FLsTT = dieta AIN-93M com 50% do teor de fibras alimentares proveniente da fibra da farinha de linhaça sem TT).

Há uma grande variabilidade nos níveis de adição ou suplementação de linhaça ou de seus produtos e a duração dos estudos, e os resultados nem sempre confirmam o efeito em alterar os lipídios séricos para um perfil protetor de doenças cardiovasculares. Em ratos, os níveis de adição de linhaça nos estudos foram 7,5 g/kg peso do animal, 10% a 20% do conteúdo total da dieta dos animais (PRASAD, 1997; KHAN *et al.*, 2007). Os estudos sobre bioativos isolados utilizaram 40 mg de lignana/kg de peso do animal, e ainda 10% da dieta proveniente do óleo da linhaça (PRASAD, 1997; PRASAD *et al.*, 1998) (PRASAD, 2005; CINTRA *et al.*, 2006; DUPASQUIER *et al.*, 2006; MEDEIROS *et al.*, 2007; PELLIZZON *et al.*, 2007; NEWAIRY; ABDON, 2009). No presente estudo, foi observado efeito positivo sobre o perfil lipídico com 12% de linhaça na dieta. O tempo de duração dos estudos na literatura variou de 28 dias a quatro meses (PRASAD, 2005; CINTRA *et al.*, 2006). Em seres humanos, estudos com linhaça que demonstraram efeito em modular positivamente o perfil lipídico, têm trabalhado com 30 a 50 g de linhaça por dia, durante um tempo que varia de quatro semanas a 12 meses (CUNNANE *et al.*, 1993; RALLIDIS *et al.*, 2003; DODIN *et al.*, 2005; PRASAD, 2005; PAN *et al.*, 2007). Cunnane *et al.* (1993) suplementaram por quatro semanas a dieta de mulheres jovens com 50 g/dia de linhaça crua ou adicionada a pães (submetida a tratamento térmico). Houve diminuição de 9% do colesterol sérico total, sem alteração nos níveis de HDL nos dois grupos que receberam linhaça, independentemente da forma de processamento, não alterando os valores plasmáticos de TG.

A administração oral de lignana isolada (40 mg/kg), por dois meses, em coelhos, levou a um aumento de 25% no HDL sem alterações no CT (PRASAD, 2005). Considerando as informações descritas na literatura sobre o teor de lignanas em linhaça, para alcançar esse nível de ingestão de lignana proposto pelo estudo anterior, um indivíduo adulto de 60 kg deveria consumir 2,4 g de lignana/dia, o que equivale a aproximadamente 800 g/dia de linhaça. Já para o rato, essa quantidade poderia ser suprida com a ingestão de 2,65 g de linhaça, equivalente a 22 g de dieta, quando a linhaça é adicionada em nível de 12%. No nosso estudo, a ingestão diária média foi de 33g, que supriria essa quantidade. Entretanto, não encontramos alterações significativas nos níveis de

## HDL.

A linhaça, no presente estudo, quando adicionada para fornecer metade da recomendação diária de fibras na dieta de roedores, reduziu em aproximadamente 18% a colesterolemia e 38% a trigliceridemia. Em seres humanos, esse nível de modulação pode representar um valor clínico positivo, auxiliando na manutenção de níveis séricos adequados de colesterol e de triacilgliceróis, visando a atender às recomendações da Sociedade Brasileira de Cardiologia dentro das categorias de baixo risco (< 160 mg/dL para o colesterol sérico e < 150 mg/dL de triacilgliceróis) (IV DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007);

A redução de colesterol total e de triacilgliceróis séricos mostrada no presente estudo pode ser explicada, em parte, pelo mecanismo do aumento da excreção de lipídios nas fezes, o que também foi demonstrado por Oliveira (2006) ao fornecer dieta contendo 70 g de semente e de farinha de linhaça desengordurada, observando que a quantidade de lipídios presente nas fezes foi, respectivamente, quatro e três vezes maior do que o do grupo que recebeu óleo de linhaça.

O aumento da excreção fecal de lipídios pode ser explicado pelo alto conteúdo de fibra da linhaça, que poderia levar ao aumento dessa excreção (EUFRÁSIO, 2003; PELLIZZON *et al.*, 2007) e, conseqüentemente, reduzir os níveis de colesterol total e triacilgliceróis plasmáticos. As fibras alimentares da linhaça são constituídas por fibras alimentares solúveis (25%) e insolúveis (75%) (BLOEDON; SZAPARY, 2004). As fibras alimentares solúveis possuem efeitos hipocolesterolêmicos, relacionados à diminuição da absorção de lipídios e da reabsorção de sais biliares, aumentando a excreção fecal do colesterol e reduzindo os níveis de colesterolemia. Os mecanismos que justificam essa redução estão relacionados a dois principais efeitos. Por um lado, a fibra alimentar sequestra, em sua matriz, os produtos da degradação da gordura como o colesterol e os triacilgliceróis, diminuindo subseqüentemente sua absorção. Por outro lado, a fibra alimentar pode sequestrar os ácidos biliares excretados nas fezes, interferindo na sua recirculação êntero-hepática, o que acarreta uma diminuição do colesterol plasmático, visto que este será utilizado para sintetizar ácidos biliares adicionais para compensar a eliminação fecal



(EUFRÁSIO, 2003).

Quanto às comparações dos efeitos entre as duas farinhas de linhaça, crua e tratada termicamente, a ausência de diferença no comportamento do perfil lipídico entre os dois grupos era esperado, pois estudos prévios mostraram estabilidade oxidativa da farinha de linhaça durante o processamento (150°C/15 min) (MORAES *et al.*, 2008). Assim, é provável que os possíveis mecanismos de ação da linhaça sobre a lipídemia, envolvendo tanto os efeitos das fibras alimentares como de moléculas bioativas, podem estar preservados em ambas as farinhas.

### **5.3.3. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no soro e em homogenados de fígado e de testículo.**

Na tabela 6 estão apresentados os valores de TBARS no soro e em homogenados de tecidos dos grupos de animais alimentados com três dietas. Houve redução dos valores de TBARS no soro dos grupos que receberam farinha de linhaça em relação ao controle, mostrando menor peroxidação de lipídios após a ingestão da dieta por 57 dias. Entretanto, não houve diferença entre os grupos que receberam farinha de linhaça.

O grupo de animais alimentados com a farinha de linhaça submetida ao tratamento térmico mostrou redução de 40% na peroxidação de lipídios no soro em comparação com o grupo controle. Já o grupo farinha de linhaça sem TT apresentou redução de 30% em relação ao controle.

Não houve diferença nos valores médios de TBARS nos homogenados de fígado e testículo entre os grupos de animais que receberam as três dietas.

Tabela 6. Valores de TBARS no soro (mmol/mL) e em homogenados de fígado e testículo (mmol/mg) de ratos *Wistar* alimentados com as dietas experimentais.

	<b>SORO</b> (nmol/mL)	<b>FÍGADO</b> (nmol/mg de proteína)	<b>TESTÍCULO</b>
<b>AIN-93M</b>	1,63 ± 0,47 a	0,086 ± 0,15 a	11,28 ± 4,98 a
<b>FLTT</b>	0,98 ± 0,14 b	0,085 ± 0,15 a	16,57 ± 11,12 a
<b>FLsTT</b>	1,14 ± 0,16 b	0,094 ± 0,19 a	18,42 ± 9,74 a

Valores expressos como médias ± DP (n= 10)

Médias, na mesma coluna, identificadas com letras diferentes, são estatisticamente diferentes (Teste Duncan, p <0,05).

TBARS = substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico

AIN-93M = controle; FLTT = dieta AIN-93M com 50% do teor de fibras alimentares proveniente da fibra da farinha de linhaça submetida ao tratamento térmico (TT); e FLsTT = dieta AIN-93M com 50% do teor de fibras alimentares provenientes da fibra da farinha de linhaça sem TT.

A reação das espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) com os ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação, que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse oxidativo celular (LIMA; ABDALLA, 2001). O TBARS é um teste que avalia aldeídos, subprodutos da peroxidação lipídica, principalmente malondialdeído. Por isso, o teste é utilizado como marcador de oxidação de ácidos graxos em sistemas biológicos. A diminuição da peroxidação de lipídios nos compartimentos do organismo, seja no soro ou nos tecidos, pode representar um mecanismo de proteção contra injúrias por estresse oxidativo. A lipoperoxidação leva à destruição da estrutura da célula, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (LIMA; ABDALLA, 2001).

O tratamento com linhaça foi eficaz em reduzir a peroxidação no soro, em ambos os grupos (FLTT e FLsTT). Esse efeito pode ser atribuído ao elevado teor de antioxidantes da linhaça. De fato, a linhaça contém compostos fenólicos, vitamina E e ácidos graxos poliinsaturados, os quais são moléculas que podem exercer ação antioxidante no meio biológico (OOMAH; MAZZA, 1997; MEAGHER; BEECHER, 2000).

Alterações no teste TBARS foram registradas somente pra o soro.

Estudos mostraram alterações nos valores de TBARS plasmáticos ao administrar lignana (PRASAD, 2001; NEWAIRY; ABDU, 2009), mas não ao adicionar a linhaça ao nível de 50 g/dia na dieta de mulheres saudáveis (CUNNANE *et al.*, 1993).

A peroxidação é um evento celular que ocorre fisiologicamente, e o meio biológico utiliza-o como um sinalizador de eventos celulares para modular morte programada (apoptose) e multiplicação celular (HADDAD, 2004). Portanto, as modulações desse evento por alimentos e compostos bioativos necessitam ser mais bem entendidas. Elas dependem do estado redox do organismo, que pode ser influenciado pela genética e pelo ambiente, incluindo a idade e a alimentação. Devemos ainda levar em consideração que o TBARS é um teste espectrofotométrico e, portanto, pode não ser o mais adequado para avaliar efeitos moleculares tênues nos tecidos ou órgãos, que ocorrem em magnitudes nanométricas. A utilização de técnicas morfológicas, como a técnica de TUNEL, pode ajudar na identificação de processo de morte celular ou apoptose.

No presente estudo, verificou-se que, para ratos adultos, ingerindo uma dieta que atende à recomendação, a ingestão de linhaça, que corresponde a 50% das fibras nas dietas, não resultou em diferença significativa na modulação do evento de peroxidação de lipídios nos tecidos, quando se utilizou o teste TBARS. Isso significa estabilidade dos tecidos frente a esse nível de ingestão de linhaça nessa idade e durante esse período experimental de exposição de 57 dias.

#### **5.3.4. Atividade das aminotransferases séricas**

Não houve diferença significativa nas atividades das aminotransferase de aspartato e de alanina entre os grupos de animais que receberam as três dietas experimentais (Tabela 7).

Aumento na atividade dessas enzimas é indicador de lesões teciduais, incluindo as células hepáticas. O aumento da atividade sérica das enzimas pode ocorrer por extravasamento da enzima, decorrência da lesão subletal da hepatócitos (THRALL, 2007). No presente estudo, a atividade das enzimas foi utilizada para investigar se haveria alguma resposta tóxica dos hepatócitos

frente à ingestão de linhaça, comparando-se os efeitos entre farinhas crua e tratada termicamente. Como não ocorreram alterações nessas medidas enzimáticas, podemos afirmar que, no nível de adição utilizado nesse estudo, nenhum constituinte químico presente na linhaça, tanto crua quanto tratada termicamente, apresentou toxicidade hepática para os animais, quando avaliado pelas aminotransferases. Assim, se algum constituinte tóxico termolábil (OOMAH; MAZZA, 1998) estava presente na linhaça crua, o nível de ingestão não foi suficiente para causar resposta hepática tóxica que resultasse em lesão tecidual.

Tabela 7. Atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) no soro de ratos *Wistar* alimentados com as dietas experimentais (U/L).

Grupo	ALT	AST
<b>AIN-93M</b>	90,03 ± 12,01 a	371,93 ± 129,49 a
<b>FLTT</b>	91,90 ± 24,04 a	326,21 ± 137,07 a
<b>FLsTT</b>	87,51 ± 20,39 a	266,98 ± 69,51 a

Valores expressos como médias ± DP (n= 10)

Médias, na mesma coluna, identificadas com letras diferentes, são estatisticamente diferentes (Teste Duncan,  $p < 0,05$ ).

AIN-93M = controle; FLTT = dieta AIN-93M com 50% do teor de fibras alimentares proveniente da fibra da farinha de linhaça submetida ao tratamento térmico (TT); e FLsTT = dieta AIN-93M com 50% do teor de fibras alimentares provenientes da fibra da farinha de linhaça sem TT.

### 5.3.5. Concentração sérica de hemoglobina total (Hb) e glicada (HbA<sub>1c</sub>)

Na tabela 8 estão apresentados os resultados referentes aos valores séricos de hemoglobina total e glicada. Não houve diferença significativa em ambos os parâmetros entre os grupos de animais alimentados com os três tipos de dieta ( $p < 0,05$ ), mostrando que nem a farinha de linhaça nem o tratamento térmico da mesma interferiram em tais parâmetros.

Os níveis séricos de Hb e de HbA<sub>1c</sub> foram investigados no presente trabalho para verificar se algum componente antinutricional da linhaça reduziria a hemoglobinemia por interferir em um nutriente envolvido na eritropoiese, incluindo a redução da absorção de proteínas e a quelação de minerais, e se o efeito da fibra alimentar e de outros fatores antinutricionais alteraria a hemoglobina glicada por interferir na resposta glicêmica pós-prandial. A não

interferência da linhaça em tais parâmetros pode ser explicada pelo fato de os animais do estudo estarem em condição fisiológica e, assim, o meio biológico mantém a homeostase sérica. Cunnane *et al.* (1993) mostraram redução de 27% na curva glicêmica ao administrar 50g de pão feito com farinha de linhaça a pacientes saudáveis, apontando para os possíveis efeitos da linhaça na glicemia pós-prandial. De fato, alimentos ricos em fibras alimentares solúveis podem diminuir a velocidade de absorção de glicose e atenuar a curva glicêmica, resultando em diminuição da glicação de proteínas plasmáticas.

A faixa de variação de Hb sérica para rato é 11 a 19 g/dL, e os resultados apresentados no estudo estão dentro da faixa de normalidade.

Tabela 8. Concentração sérica de hemoglobina total (Hb) e de hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>) de ratos *Wistar* alimentados com as dietas experimentais.

	<b>Hb Total (g/dL)</b>	<b>HbA<sub>1c</sub> (%)</b>
<b>AIN-93M</b>	14,70 ± 1,38 a	9,49 ± 2,58 a
<b>FLTT</b>	15,19 ± 0,58 a	9,14 ± 2,93 a
<b>FLsTT</b>	14,67 ± 2,63 a	11,15 ± 2,50 a

Valores expressos como médias ± DP (n= 10)

Médias, na mesma coluna, identificados com letras diferentes, são estatisticamente diferentes (Teste Duncan, p < 0,05)

AIN-93M = controle; FLTT = dieta AIN-93M com 50% do teor de fibras alimentares proveniente da fibra da farinha de linhaça submetida ao tratamento térmico (TT); e FLsTT = dieta AIN-93M com 50% do teor de fibras alimentares provenientes da fibra da farinha de linhaça sem TT.

#### **5.4. Efeitos da ingestão da farinha de linhaça sobre fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis em ratos alimentados com dieta de cafeteria**

##### **5.4.1. Consumo alimentar médio, ganho de peso corporal total, coeficiente de eficiência alimentar (CEA), índice hepatossomático- IHS e índice gonadossomático (IGS)**

Os dois grupos alimentados com dieta de cafeteria (CAF e CAFL) apresentaram consumo alimentar estatisticamente menor, 22,74 e 23, 29% respectivamente, em relação ao grupo AIN-93M. Entretanto, o grupo CAF apresentou um ganho de peso corporal médio de 19,4g (11,38%) mais elevado do que o grupo AIN- 93M, mas a diferença do parâmetro entre os dois grupos não foi estatisticamente significativa. A adição de linhaça na dieta de cafeteria elevou a média de ganho de peso corporal em 52,5g (25,79%) em relação ao grupo AIN-93M e o parâmetro em 33,1g (16,26%), quando comparado com o grupo CAF. Entretanto, nenhuma dessas diferenças foi estatisticamente significativa.

O CEA não diferiu entre os grupos CAF e CAFL, mostrando que a adição da farinha de linhaça na dieta de cafeteria não interferiu na densidade energética da dieta (Tabela 3). O CEA das dietas de cafeteria foi estatisticamente mais elevado em comparação com o grupo AIN-93M, em aproximadamente 40%, em decorrência da densidade energética. Outros estudos também demonstraram redução do consumo alimentar (10,6%) dos animais alimentados com dieta de cafeteria por 42 dias, em relação ao grupo controle comercial não obeso (CAMPION; MARTINEZ, 2004). Os autores atribuem esse resultado ao ajuste pela maior eficiência energética dessa dieta.

Como a dieta de cafeteria é um modelo de indução de obesidade exógena (CESARETTI; KOHLMANN, 2006), esperava-se incremento do peso ao final do estudo em magnitudes estatisticamente significativas, porém nota-se tendência de ganho de peso dos grupos alimentados com essa dieta. Esse ganho de peso adicional (acima do fisiológico) pode romper a homeostase biológica do animal e modificar os parâmetros fisiológicos.

Tabela 9. Consumo alimentar total, ganho de peso corporal total, coeficiente de eficiência alimentar (CEA), índice hepatossomático (IHS) e índice gonadossomático (IGS) de ratos *Wistar* alimentados com as dietas experimentais.

	AIN-93M*	CAF	CAFL
<b>Consumo total</b>	1938,66 ± 113,67 a	1497,84 ± 102,33 b	1487,04 ± 116,04 b
<b>Ganho de peso (g)</b>	151,00 ± 31,75 a	170,40 ± 53,80 a	203,50 ± 84,81 a
<b>CEA**</b>	0,08 ± 0,02 b	0,12 ± 0,04 a	0,11 ± 0,02 a
<b>IHS***</b>	3,45 ± 0,36 a	3,44 ± 0,37 a	3,11 ± 0,42 a
<b>IGS****</b>	0,49 ± 0,05 a	0,52 ± 0,05 a	0,51 ± 0,05 a

Valores expressos como médias ± DP (n= 10)

Médias, na mesma coluna, identificadas com letras diferentes, são estatisticamente diferentes (Teste Duncan, p < 0,05).

\* AIN 93M = dieta controle; CAF= dieta de cafeteria; CAFL= dieta de cafeteria + 12,5% de farinha de linhaça com TT, o que equivale à proporção de 1/8 dos ingredientes totais da dieta.

\*\* CEA (coeficiente de eficiência alimentar) = ganho de peso do animal (g)/ consumo da dieta (g)

\*\*\* IHS = PF/PC, onde: IHS = índice hepatossomático; PF = g peso fígado; PC = g peso corporal

\*\*\*\* IGS = PT/PC, onde: IGS = índice gonadossomático; PT = g peso testículo; PC = g peso corporal

O percentual de ganho de peso dos animais alimentados com dieta de cafeteria no presente estudo está na faixa descrita na literatura, mesmo na ausência de significância estatística. Estudos utilizando a dieta de cafeteria como modelo indutor da obesidade exógena mostraram aumento de peso de 16 a 54% em relação aos controles não obesos (MARGARETO *et al.*, 2000; GARCIA-DIAZ *et al.*, 2009), sendo que os tratamentos variaram entre 14 e 56 dias (MILAGRO *et al.*, 2006; GARCIA-DIAZ *et al.*, 2009). Ao fornecer dieta de cafeteria por 42 dias a ratas *Wistar*, Campion ; Martinez (2004) mostraram que o ganho de peso foi 29% maior no grupo cafeteria em relação ao controle não obeso. Garcia-Diaz *et al.* (2009) alimentaram ratos *Wistar* adultos com dieta de cafeteria por 14 dias e observaram ganho de peso corporal 54% maior que o grupo controle não obeso. Margareto *et al.* (2000) também demonstraram ganho de peso dos animais ao utilizar a dieta de cafeteria como modelo de indução de obesidade em ratas *Wistar* por 30 dias, tendo observado aumento no peso corporal de 16% em relação ao grupo-controle não obeso.

Para aprofundar o entendimento sobre o efeito da dieta de cafeteria e linhaça sobre o ganho de peso, foram analisados o ganho de peso corporal e o

consumo alimentar semanal dos animais (Figura 2).

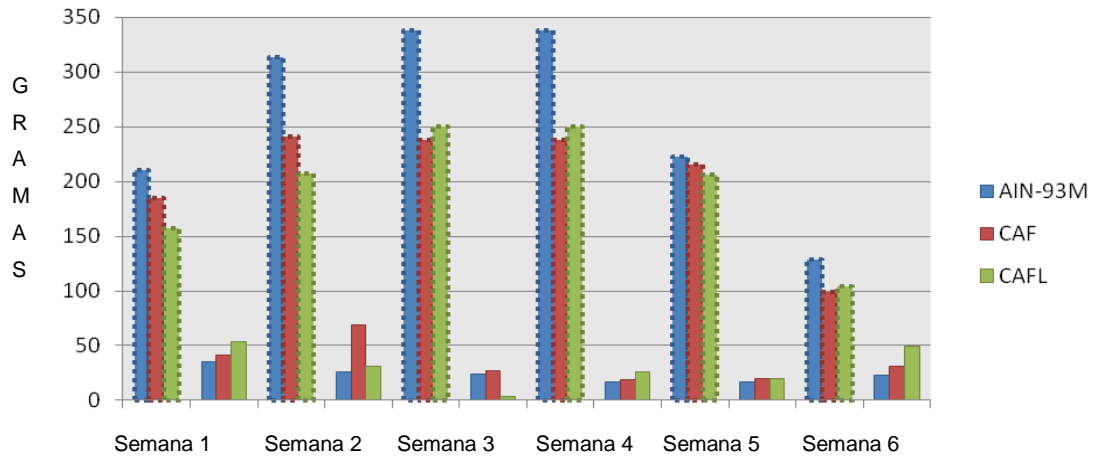


Figura 2 – Consumo alimentar (barras tracejadas) e ganho médio de peso corporal semanal de ratos *Wistar* tratados com dietas CAF: dieta de cafeteria (n= 10), CAFL: dieta de cafeteria + linhaça a 12,5% com TT (n= 10) e AIN-93M (n= 10).

Analisando-se os perfis do consumo alimentar e do ganho de peso corporal, verificou-se que o grupo AIN-93M apresentou maior consumo durante todo o experimento, porém os grupos que receberam dieta de cafeteria apresentaram média de ganho de peso acima do grupo AIN-93M durante todo o período do experimento. Nas duas primeiras semanas, ocorreu uma aceleração do ganho de peso. Esse resultado pode ser explicado pela elevada densidade energética da dieta de cafeteria. A inclusão da linhaça em nível de 12,5% na dieta de cafeteria mostrou ganho de peso inferior em relação aos outros grupos na segunda e terceira semana de experimento e ganho de peso ascendente posteriormente. Ao administrar o óleo de linhaça, o estudo mostrou a manutenção do peso corporal de ratos *Wistar* ao ser administrado por um período menor, 28 dias, juntamente com dieta rica em gordura (CINTRA *et al.*, 2006).

No presente estudo não foram observadas diferenças nos índices hepatossomático e gonadossomático entre os grupos experimentais, embora as análises histopatológicas do tecido hepático tenham demonstrado maior acúmulo de gordura no fígado dos animais CAF (Figura 3). Era esperado que os fígados apresentassem maior peso, com conseqüente aumento do índice hepático nesse grupo.

Nem a dieta de cafeteria, nem a inclusão da linhaça na dieta de cafeteria



alteraram significativamente o IGS entre os grupos. São escassos na literatura estudos que avaliam este parâmetro no modelo de dieta de cafeteria.

#### **5.4.2. Perfil lipídico sérico e teor de lipídios nas fezes**

Na Tabela 10 estão apresentadas as concentrações séricas de colesterol total, de HDL, de triacilglicerol, a razão colesterol total/HDL e o teor de lipídios presentes nas fezes.

O grupo CAF mostrou colesterolemia significativamente menor que o grupo AIN-93M e não diferiu do grupo CAFL. A concentração sérica de colesterol total apresentada pelo grupo CAF foi 18% menor que a do grupo AIN-93M. A adição de linhaça não interferiu na colesterolemia, pois entre os grupos CAF e AIN-93M não houve diferença significativa.

Não houve diferença entre os valores de HDL e da razão CT/HDL entre os grupos de animais que receberam os três tipos de dietas.

A análise de TG mostrou que o grupo CAFL foi significativamente menor que os grupos AIN-93M e CAF, os quais não diferiram entre si. O grupo de animais alimentados com dieta CAFL apresentou trigliceridemia 23% menor que os grupos AIN-93M e CAF.

O grupo de CAFL apresentou maior conteúdo de lipídios nas fezes em comparação com os outros dois grupos. O valor apresentado pelo grupo CAFL foi 5,5 vezes maior que o grupo AIN-93M, e o grupo CAF mostrou excreção fecal de lipídios 4,3 vezes mais elevada do que o grupo AIN-93M. O teor de lipídios excretados nas fezes diferiu entre os grupos cafeteria, sendo que os valores médios apresentados pelo grupo CAFL foram 1,3 vezes maiores que o grupo CAF.

A redução da colesterolemia do grupo CAF e CAFL pode ser explicada pelo acúmulo de lipídios no fígado (Figura 3). Ao administrar a linhaça, os níveis de colesterol mostraram tendência à redução quando comparados ao grupo AIN-93M. Estudos que administraram a dieta de cafeteria a ratos *Wistar* por 14 a 42 dias não demonstraram alterações na colesterolemia (CAMPION; MARTINEZ, 2004; GARCIA-DIAZ *et al.*, 2009). Porém, estudo que forneceu dieta rica em lipídios (1% de colesterol, 5% de banha e 10% de óleo de soja) mostrou menores níveis do colesterol do grupo alimentado com a dieta hipercolesterolêmica do que com a dieta AIN 93 (CINTRA *et al.*, 2006). Os

autores atribuíram esse achado ao mecanismo de *feedback* negativo causado pela alta ingestão de colesterol da dieta.

A dieta de cafeteria não induziu à hipertrigliceridemia. Em outros estudos, os TG também não se alteraram com a ingestão de dieta de cafeteria por ratos *Wistar* por 42 dias (CAMPION; MARTINEZ, 2004). Porém, a linhaça foi eficaz em reduzir a trigliceridemia plasmática nos animais alimentados com a dieta obesogênica. Esse resultado era esperado, já que os compostos bioativos da linhaça possuem comprovada ação hipotrigliceridêmica, incluindo fibras alimentares e  $\omega$ -3, principalmente (IV DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

A administração da dieta de cafeteria levou à maior excreção de lipídios nas fezes. Esse efeito foi demonstrado em outros estudos de Oliveira (2006). Ao fornecer semente ou farinha de linhaça desengordurada para indivíduos adultos, verificou-se que a quantidade de lipídios presentes nas fezes foi respectivamente quatro e três vezes maior do que o grupo que recebeu óleo de linhaça (OLIVEIRA, 2006). O aumento da excreção fecal de lipídios pode ser explicado pelo alto conteúdo de fibra alimentar da linhaça (EUFRÁSIO, 2003; PELLIZZON *et al.*, 2007), que, conseqüentemente, pode alterar os níveis de triacilgliceróis plasmáticos, porém, isso não ocorreu com o tratamento AIN-93M, provavelmente devido ao baixo teor de lipídios da dieta em relação aos outros grupos.

Tabela 10. Concentrações séricas de colesterol total (CT), triacilglicerol (TG), lipoproteína de alta densidade (HDL) e teor de lipídios nas fezes de ratos *Wistar* alimentados com as dietas experimentais

	AIN-93M *	CAF	CAFL
<b>CT (mg/dL)</b>	128,21 ± 24,49 b	105,13 ± 10,97 a	120,56 ± 19,42 ab
<b>HDL (mg/dL)</b>	47,44 ± 8,35 a	38,18 ± 6,74 a	42,05 ± 7,91 a
<b>TG (ng/dL)</b>	215,22 ± 40,74 a	215,09 ± 47,07 a	165,24 ± 57,19 b
<b>CT/ HDL</b>	2,72 ± 0,37 a	2,91 ± 0,42 a	2,90 ± 0,36 a
<b>Lipídios nas fezes (%)</b>	3,09 ± 0,55 c	13,29 ± 1,56 b	16,86 ± 2,25 a

Valores expressos como médias ± DP (n= 10)

Médias, na mesma coluna, identificadas com letras diferentes, são estatisticamente diferentes (Teste Duncan, p < 0,05).

\* AIN 93M = dieta controle; CAF= dieta de cafeteria; CAFL= dieta de cafeteria + 12,5% de farinha de linhaça com TT, o que equivale à proporção de 1/8 dos ingredientes totais da dieta.

### **5.4.3. Peroxidação de lipídios**

Os valores médios de TBARS estão apresentados na tabela 11.

Após 57 dias de consumo das dietas CAF e CAFL, os valores de TBARS nos homogenados de fígado foram significativamente mais elevados em comparação com o grupo de animais que recebeu dieta AIN-93M. Não houve diferença estatística nesse parâmetro para as dietas de cafeteria. A administração de dieta de cafeteria por 56 dias também induziu o estresse oxidativo no fígado de *Wistar* no estudo de Milagro *et al.* (2006).

No soro e no testículo, os valores de TBARS não diferiram entre os grupos experimentais.

O teste TBARS é um bom marcador da peroxidação lipídica e é utilizado como marcador do estresse oxidativo celular (LIMA; ABDALLA, 2001). Há estudos mostrando o aumento do estresse oxidativo por dieta hipercolesterolêmica ((PRASAD, 2001; PRASAD, 2005) e na condição de obesidade (MOHORA *et al.*, 2007).

Apesar da presença de vários compostos bioativos com ação antioxidante na linhaça (OOMAH; MAZZA, 1998; PRASAD, 2005), nesse estudo foi observado efeito antioxidante da farinha de linhaça para diminuir a peroxidação de lipídios induzida pela dieta de cafeteria. A defesa antioxidante *in vivo* depende de mecanismos endógenos que atuam sinergisticamente com os antioxidantes exógenos (NORDBERG *et al.*, 2001).

Valores de TBARS em animais podem apresentar variabilidade de 40% (MILAGRO *et al.*, 2006), indicando que a resposta adaptativa pode variar entre os animais. Os mecanismos de adaptação dos compartimentos biológicos frente aos eventos oxidativos são ainda pouco compreendidos. Sabe-se que a interação de mecanismos endógenos e exógenos, ou seja, o sinergismo, é que determina a homeostase redox das células (RIBEIRO *et al.*, 2008) e, por isso, os estudos sobre efeitos antioxidantes de compostos bioativos e de alimentos são muito conflitantes. Pode ser que até mesmo a idade dos animais interfira nos mecanismos de resposta adaptativa frente aos bioativos antioxidantes da dieta.

Tabela 11. Valores de TBARS no soro (mmol/mL) e em homogenados de fígado e testículo (mmol/mg) de ratos *Wistar* alimentados as dietas experimentais.

	<b>SORO</b> (nmol/L)	<b>FÍGADO</b> (nmol/mg de proteína)	<b>TESTÍCULO</b>
<b>AIN-93M*</b>	1,63 ± 0,47 a	0,08 ± 0,03 b	11,28 ± 4,88 a
<b>CAF</b>	1,42 ± 0,61 a	0,58 ± 0,43 a	22,00 ± 15,66 a
<b>CAFL</b>	1,82 ± 0,12 a	0,89 ± 0,45 a	22,52 ± 15,44 a

Valores expressos como médias ± DP (n= 10)

Médias, na mesma coluna, identificadas com letras diferentes, são estatisticamente diferentes (Teste Duncan, p < 0,05).

TBARS = substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico. .

\*AIN 93M = dieta controle; CAF= dieta de cafeteria; CAFL= dieta de cafeteria + 12,5% de farinha de linhaça com TT, o que equivale à proporção de 1/8 dos ingredientes totais da dieta

#### **5.4.4. Atividade de aminotransferases séricas**

A atividade das enzimas aminotransferases séricas nos grupos experimentais está apresentada na tabela 12.

Houve diferença estatística entre as concentrações séricas de alanina. O grupo AIN-93M apresentou menor concentração sérica dessa enzima que os grupos que receberam dieta de cafeteria. Os valores de atividade de ALT apresentados pelo grupo AIN-93M foram, respectivamente, 31% e 35% menores do que a dieta CAF e CAFL. A atividade da ALT não diferiu entre os grupos CAF e CAFL. Não houve diferença nas médias da atividade de AST entre os grupos de animais. Porém, ALT é mais hepato-específica do que AST, sendo que o AST pode ser normal ou estar discretamente alterado em doenças hepáticas crônicas graves (THRALL, 2007).

As análises das enzimas aminotransferases séricas (ALT e AST) são importantes indicadores de lesões nas células hepáticas. E sabe-se que componentes da dieta podem modular a atividade das aminotransferases séricas. No presente estudo, a dieta de cafeteria ingerida por 57 dias induziu lesão tecidual hepática, aumentando as aminotransferases séricas, mas a administração da farinha de linhaça não interferiu no parâmetro. Souza *et al.* (2008) mostraram alteração dos valores de AST e não de ALT ao administrar a ratas *Wistar* 2 e 4% de chá feito com a semente de *Eugenia jambolana*, por 21 dias.

Sabe-se que o fígado reage às lesões oxidativas tanto pelo aumento de peroxidação de lipídios quanto pelo rompimento da integridade da membrana celular, com o extravasamento de enzimas que estão compartimentalizadas no citosol, incluindo as aminotransferases. Os antioxidantes da dieta podem reduzir a lesão hepática, atenuando as reações oxidativas e inibindo fatores de transcrição relacionados à expressão de proteínas inflamatórias (YUAN *et al.*, 2008).

Tabela 12. Atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) no soro de ratos *Wistar* alimentados as três dietas experimentais (U/L).

	ALT (U/L)	ASP (U/L)
<b>AIN- 93 M</b>	90,03 ± 12,01 b	371,93 ± 129,49 a
<b>CAF</b>	130,76 ± 22,03 a	399,23 ± 120,32 a
<b>CAF-L</b>	137,79 ± 110,13 a	420,56 ± 202,72 a

Valores expressos como médias ± DP (n= 10)

Médias, na mesma coluna, identificadas com letras diferentes, são estatisticamente diferentes (Teste Duncan,  $p < 0,05$ ).

\*AIN 93M = dieta controle; CAF= dieta de cafeteria; CAFL= dieta de cafeteria + 12,5% de farinha de linhaça com TT, o que equivale à proporção de 1/8 dos ingredientes totais da dieta

#### 5.4.5. Concentração sérica de Hemoglobina total (Hb) e de hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>)

Na tabela 13 estão apresentados os resultados da concentração sérica de Hb e HbA<sub>1c</sub>, apresentada pelos animais submetidos aos três tipos de dietas.

Ocorreu diferença significativa na concentração de hemoglobina glicada entre os grupos ( $p < 0,05$ ). As médias de HbA<sub>1c</sub> do grupo CAF foram significativamente maiores que as dos outros grupos. Os valores não diferiram entre o grupo AIN-93M e o grupo CAFL. O grupo CAF apresentou hemoglobina glicada 74 % maior que o grupo AIN-93M e 60% maior que CAFL.

Os níveis de Hb também foram diferentes entre os grupos experimentais, sendo que os grupos CAF e CAFL apresentaram maiores níveis séricos de Hb em relação ao grupo AIN-93M. Esse aumento foi de 51%, sem diferença estatística entre as dietas de cafeteria.

O estresse oxidativo pode induzir à hiperglicemia por modificar as proteínas intracelulares, com conseqüentemente perda de função. A glicação

de proteínas *in vivo* é um mecanismo lento e reversível em concentrações fisiológicas de glicose, mas torna-se rápida na condição de elevadas concentrações de glicose sanguínea, ocorrendo glicação de proteínas de vida média mais longa, incluindo a Hb. Os oxidantes auxiliam na fixação dos produtos de glicação, tornando-os estáveis (MOHORA *et al.*, 2007). Portanto, o estado redox do organismo pode ser um fator importante para modulação da concentração de produtos de glicação *in vivo*. A linhaça, por ser um alimento rico em antioxidantes, ao nível de 12,5% foi capaz de reduzir a HbA<sub>1c</sub> elevada pela dieta de cafeteria, modulando-a para níveis fisiológicos. Esse resultado representou atenuação de 100% do efeito estimulador de glicação de HbA<sub>1c</sub> pela dieta de cafeteria e que pode ter ocorrido via mecanismo de estresse oxidativo, já que a dieta de cafeteria é um modelo de indução de obesidade e estresse oxidativo.

Prasad (2001) também demonstrou redução da hemoglobina glicada, ao administrar 40 mg/kg/dia de lignana em ratos Zucker, sugerindo o possível efeito antioxidante da lignana. Essa quantidade de lignana poderia ser suprida com a ingestão de 2,65 g de linhaça, o equivalente a 22 g de dieta, quando a linhaça é adicionada em nível de 12%. Nesse estudo, a ingestão diária média foi de 33g, que supriria essa quantidade. Entretanto, não encontramos alterações significativas nos níveis de HDL.

Os grupos que receberam dieta de cafeteria apresentaram maiores níveis séricos de Hb do que o grupo AIN-93M. Esses resultados poderiam ser explicados pela diferença nos teores de Fe das dietas. Entretanto, o teor de Fe foi calculado e verificou-se que as dietas AIN-93M, CAF e CAFL contêm 4,2, 2,6 e 2,9 mg de Fe em 100g de dieta, respectivamente. O Fe da dieta AIN-93M está na forma de citrato férrico e para cálculo foram considerados a contaminação da caseína normalmente ocorrida por esse micronutriente, que é da ordem de 5,43% (SAKON, 2008). As dietas de cafeteria tinham ingredientes de origem animal que contêm Fe heme. Apesar do menor conteúdo de Fe dessas dietas, pode ter ocorrido maior biodisponibilidade desse micronutriente em relação à AIN-93M. Além disso, outras interações químicas podem ter ocorrido em função das diferentes matrizes alimentares.

Tabela 13. Concentração sérica de hemoglobina (Hb) e de hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>) de ratos *Wistar* alimentados com as dietas experimentais.

	Hb Total (g/dL)	HbA <sub>1c</sub> (%)
<b>Controle AIN-93M</b>	14,71 ± 1,38 b	9,49 b ± 2,58
<b>Controle Cafeteria</b>	22,26 ± 4,00 a	16,53 a ± 5,97
<b>Cafeteria Linhaça</b>	22,82 ± 4,82 a	9,89 b ± 1,63

Valores expressos como médias ± DP (n= 10)

Médias, na mesma coluna, identificadas com letras diferentes, são estatisticamente diferentes (Teste Duncan, p < 0,05).

\*AIN 93M = dieta controle; CAF= dieta de cafeteria; CAFL= dieta de cafeteria + 12,5% de farinha de linhaça com TT, o que equivale à proporção de 1/8 dos ingredientes totais da dieta

#### 5.4.6. Histologia hepática

A Figura 4 representa as observações histológicas nos diferentes tratamentos. A área de gordura foi determinada nos diferentes tratamentos. O grupo comercial, utilizado como modelo padrão de histologia para roedores, apresentou menor deposição de gordura no tecido hepático quando comparado com os grupos CAF e CAFL. Verificou-se que o grupo CAFL apresentou uma área de gordura maior em relação ao grupo cafeteria controle, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa (Figura 3).

O maior acúmulo de gordura pelo grupo CAF e CAFL não resultou em alteração do índice hepatossomático, mas pode representar uma disfunção metabólica inicial, associada à obesidade. Por outro lado, podem-se justificar parcialmente os menores níveis de colesterol apresentados pelo grupo CAF.

No presente estudo, o não efeito da linhaça para reduzir a deposição de gordura hepática diferiu dos resultados apresentados por outros autores, que demonstraram a eficiência da linhaça em evitar o acúmulo de gordura no fígado. Cintra *et al.* (2006) alimentaram ratos *Wistar* com dieta rica em gordura (1% colesterol, 10% óleo de soja e 5% de banha) por 28 dias, e mostraram acúmulo de lipídios no fígado desses animais, sendo que o grupo rico em gordura que recebeu 10% de linhaça em substituição ao óleo de soja não mostrou acúmulo de gordura, equiparando-se ao AIN-93G.

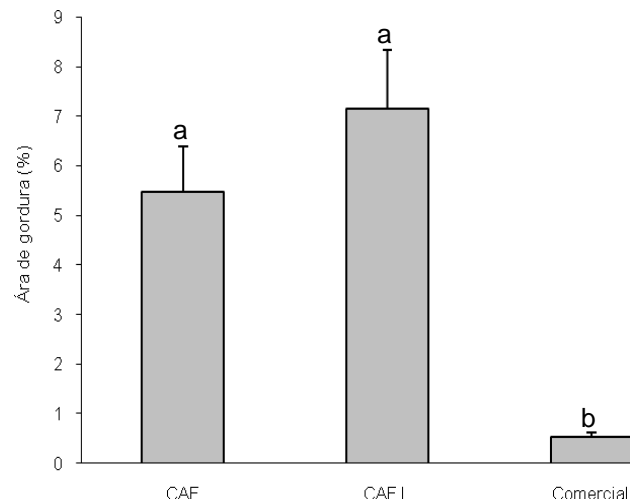


Figura 3 - Percentual de gordura no tecido hepático de ratos *Wistar* tratados com dietas de CAF: dieta de cafeteria (n= 6), CAFI: dieta de cafeteria + linhaça a 12,5% (n= 6); e C: ração comercial (n= 6).

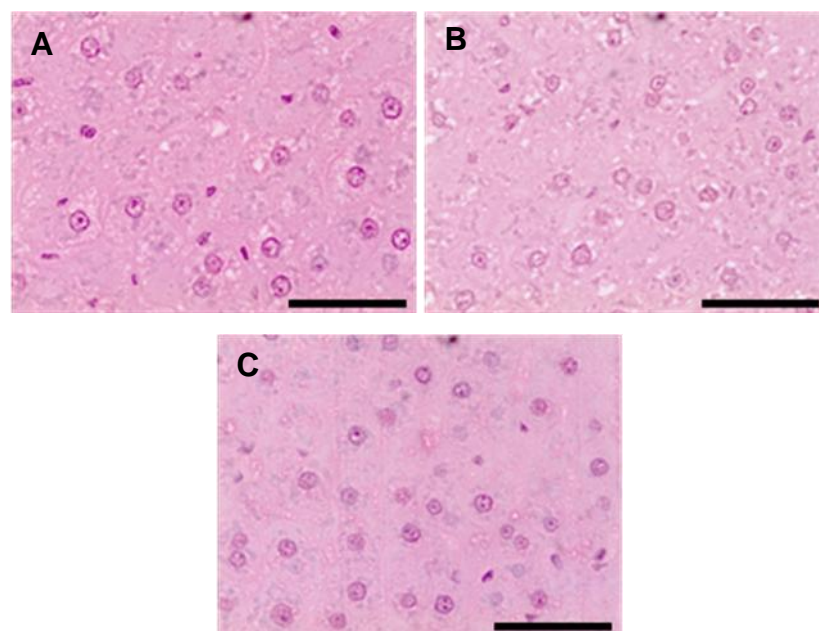


Figura 4 - Aspectos histológicos de fígados dos animais dos grupos experimentais. Aspecto geral das áreas de gordura encontradas nos grupos: A: CAF- dieta de cafeteria (n= 6); B: CAFI- dieta de cafeteria + linhaça a 12,5% (n= 6) e C: ração comercial (n= 6). Hematoxilina/Eosina. 50  $\mu$ m.

O aumento da deposição de gordura no fígado é uma injúria hepática que pode ocorrer na obesidade pela ingestão de dietas hipercalóricas (LIEW *et al.*, 2006). Essa alteração histológica fornece subsídios para afirmar que a



redução de colesterol sérico pela dieta de cafeteria não pode ser interpretada com um fator protetor de DCNT, pois outras alterações metabólicas ocorreram, incluindo o aumento de depósito de gordura no fígado desses animais. O aumento de depósitos de gordura hepática é um estágio inicial da degeneração gordurosa do fígado, que pode interferir na integração metabólica do organismo, favorecendo a manutenção da obesidade.

## 6. CONCLUSÃO

Os efeitos da adição de farinha de linhaça sobre os fatores de risco de DCNT foram diferentes nas duas condições nutricionais testadas: dieta equilibrada e dieta obesogênica.

Animais alimentados com dieta equilibrada adicionada de linhaça apresentaram redução CT, TG, TBARS (soro) e da absorção de gordura da dieta.

Quando alimentados com dieta obesogênica adicionada de linhaça, foram observadas redução dos TG, HbA<sub>1c</sub> e absorção de gordura da dieta.

O tratamento térmico da linhaça não influenciou seus efeitos hipocolesterolêmicos e hipotrigliceridêmicos.

O consumo de farinha de linhaça crua não foi considerado um fator de risco de toxicidade tendo em vista os parâmetros analisados.

## **7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Estão em andamento as visualizações histológicas do tecido intestinal, porção do duodeno e do íleo, dos testículos de todos os grupos e dos tecidos hepáticos dos grupos que receberam dieta equilibrada.

No tecido hepático será quantificada a área de gordura dos grupos que receberam dieta equilibrada e analisada a presença de áreas com fibrose em todos os grupos.

No tecido intestinal serão analisadas altura das vilosidades e criptas intestinais e presença de infiltrado de mononucleares.

No tecido dos testículos serão realizadas análises de morfometria (diâmetro, comprimento e volume dos túbulos seminíferos, altura do epitélio seminífero), proporção túbulo/intertúbulo e cálculo da produção espermática diária.

Será ainda verificada a presença de células apoptóticas no tecido do testículo por imuno-histoquímica.

Mais estudos são necessários para avaliar o potencial tóxico da ingestão de linhaça visando a estipular o consumo seguro de sua farinha.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDER, B. P.; EDEL, A. L.; MCCULLOUGH, R.; RODRIGUEZ-LEYVA, D.; RAMPERSAD, P.; GILCHRIST, J. S. C.; LUKAS, A.; PIERCE, G. N. Distribution of omega-3 fatty acids in tissues of rabbits fed a flaxseed-supplemented diet. *Metabolism*. v. 59, n.5, p. 620-627, 2009.

AOAC. Official Methods of Analysis of the AOAC International. A. O. O. A. Chemists. Gaithersburg. 1998.

ARAÚJO, B. M. *Morfometria testicular em ratos wistar adultos tratados com paracetamol (acetaminofeno)*. (2008). 65 f. - Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

AUSTRIA, J. A.; RICHARD, M. N.; CHAHINE, M. N.; EDEL, A. L.; MALCOLMSON, L. J.; DUPASQUIER, C. M. C.; PIERCE, G. N. Bioavailability of Alpha-Linolenic Acid in Subjects after Ingestion of Three Different Forms of Flaxseed. *Journal of the American College of Nutrition*. v. 27, n. 2, p. 214-221, 2008.

BABU, U. S.; WIESENFELD, P. W.; COLLINS, T. F. X.; SPRANDO, R.; FLYNN, T. J.; BLACK, T.; OLEJNIK, N.; RAYBOURNE, R. B. Impact of high flaxseed diet on mitogen-induced proliferation, IL-2 production, cell subsets and fatty acid composition of spleen cells from pregnant and F1 generation Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*. v. 41, n. 6, p. 905-915, 2003.

BARCELO-COBLIJN, G.; MURPHY, E. J.; OTHMAN, R.; MOGHADASIAN, M. H.; KASHOUR, T.; FRIEL, J. K. Flaxseed oil and fish-oil capsule consumption alters human red blood cell n-3 fatty acid composition: a multiple-dosing trial comparing 2 sources of n-3 fatty acid. *American Journal of Clinical Nutrition*. v. 88, n. 3, p. 801-809, 2008.

BARRE, D. E.; MIZIER-BARRE, K. A.; GRISCTI, O.; HAFEZ, K. High dose flaxseed oil supplementation may affect fasting blood serum glucose management in human type 2 diabetics. *Journal of Oleo Science* v. 57, n. 5, p. 269-273, 2008.

BASSETT, C.; RODRIGUEZ-LEYVA, D.; PIERCE, G. Experimental and clinical research findings on the cardiovascular benefits of consuming flaxseed. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism*. v. 34, n. 5, p. 965-74, 2009.

BERGLUND, D. Flax: New uses and demands. In: WHIPKEY, J. A. A. (Ed.). *Trends in New Crops and New Uses*. Alexandria, VA: ASHS Press, p. 358-360.

BERRAONDO, B.; MARTI, A.; DUNCAN, J.; TRAYHURN, P.; MARTÍNEZ, J. Up-regulation of muscle UCP2 gene expression by a new beta3-adrenoceptor agonist, trecadrine, in obese (cafeteria) rodents, but down-regulation in lean animals. *International Journal of Obesity Related Metabolism Desord*. v. 24, n. 2, p. 156-163, 2000.

BLOEDON, L. T.; SZAPARY, P. O. Flaxseed and cardiovascular Risk. *Nutrition Reviews*. v. 62, n. 1, p. 18-27, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999*. Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. In: SANITÁRIA, A. N. D. V. (Ed.). Brasília, DF, 1999a: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=109>.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999*. Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. In: SANITÁRIA, A.N.D.V.(Ed.). Brasília, DF, 1999b: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=110>.

BRASIL. Diário Oficial da União. In: SAÚDE, M. D. (Ed.). Brasília: Resolução - RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003.

BUEGE, J. A.; AUST., S. D. Microsomal lipid peroxidation. In: FELISHER, S.; PACKER, L. (Ed.). *Methods in enzymology*. San Diego: Academic Press, 1978.

CAMPION, J.; MARTINEZ, J. A. Ketoconazole, an antifungal agent, protects against adiposity induced by a cafeteria diet. *Hormone and Metabolic Research*. v. 36, p. 485-491, 2004.

CARRARO, J. C. C. *Caracterização nutricional, potencial antioxidante e estabilidade de farinhas integrais de linhaça*. Viçosa, 2009, 87 p. Relatório (Iniciação Científica - PIBIC/CNPq), Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa (UFV).

CARRARO, J. C. C.; DANTAS, M. I. D. S.; MARTINO, H. S. D.; CASTRO, F. F.; RIBEIRO, S. M. R. Efeito do armazenamento sobre teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de farinha de linhaça. In: VIÇOSA, U. F. D. (Ed.). *SIC - Simpósio de Iniciação Científica*. Viçosa 2009.

CARRARO, J. C. C.; LUCAS, C. G.; MORAIS, D. D. C.; MORAES, É. A.; DANTAS, M. I. D. S.; DUARTE, H. S. M.; CASTRO, F. F.; RIBEIRO, S. M. R. Efeito do tratamento térmico sobre a peroxidação lipídica, o teor de ômega-3 e de fenólicos totais de sementes de linhaça escura. *X SBAN*. São Paulo, 2009.

CARRARO, J. C. C.; REIS, B. D. L.; OLIVEIRA, D. S.; DUARTE, H. S. M.; SANT'ANA, H. M. P.; RIBEIRO, S. M. R. Teor de fenólicos totais, vitamina E e potencial antioxidante de sementes de linhaça escura e dourada. *X SBAN*. São Paulo, 2009.

CARRARO, J. C. C.; RIBEIRO, S. M. R.; ESPESCHIT, A. C. R.; MARTINO, H. S. D.; CASTRO, F. A. F. D.; DANTAS, M. I. D. S. Composição nutricional e teor de fenólicos totais de sementes de linhaça escura e dourada. *III COMAN*. Ouro Preto, 2009.

- CESARETTI, M. L. R.; KOHLMANN JUNIOR, O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia ; Metabologia*. v. 50, p. 190-197, 2006.
- CINTRA, D. E. C.; COSTA, A. G. V.; PELUZIO, M. C. G.; MATTA, S. L. P.; SILVA, M. T. C.; COSTA, N. M. B. Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout, or chicken skin. *Nutrition* v. 22, n. 2, p. 197-205, 2006.
- CONN, E. E. Cyanogenic glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 17, n. 3, p. 519-526, 1969.
- COSKUNER, Y.; KARABABA, E. Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Food Engineering*. v. 78, n. 3, p. 1067-1073, 2007.
- CUNNANE, S. C.; GANGULI, S.; MENARD, C.; LIEDE, A. C.; HAMADEH, M. J.; CHEN, Z.-Y.; WOLEVER, T. M. S.; JENKINS, D. J. A. High-linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): some nutritional properties in humans. *British Journal of Nutrition*. v. 69, n. 02, p. 443-453, 1993.
- DEMARK-WAHNEFRIED, W.; PRICE, D. T.; POLASCIO, T. J.; ROBERTSON, C. N.; ANDERSON, E. E.; PAULSON, D. F.; WALTHER, P. J.; GANNON, M.; VOLLMER, R. T. Pilot study of dietary fat restriction and flaxseed supplementation in men with prostate cancer before surgery: exploring the effects on hormonal levels, prostate-specific antigen, and histopathologic features. *Urology*. v. 58, n. 1, p. 47-52, 2001.
- DODIN, S.; LEMAY, A.; JACQUES, H.; LEGARE, F.; FOREST, J. C.; MASSE, B. The Effects of Flaxseed Dietary Supplement on Lipid Profile, Bone Mineral Density, and Symptoms in Menopausal Women: A Randomized, Double-Blind, Wheat Germ Placebo-Controlled Clinical Trial. *Journal of Clinical Endocrinology ; Metabolism*. v. 90, n. 3, p. 1390-1397, 2005.
- DUDA, M. K.; O'SHEA, K. M.; TINTINU, A.; XU, W.; KHAIRALLAH, R. J.; BARROWS, B. R.; CHESS, D. J.; AZIMZADEH, A. M.; HARRIS, W. S.; SHAROV, V. G.; SABBAH, H. N.; STANLEY, W. C. Fish oil, but not flaxseed oil, decreases inflammation and prevents pressure overload-induced cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res*. v. 81, n. 2, p. 319-327, 2009.
- DUPASQUIER, C. M. C.; WEBER, A. M.; ANDER, B. P.; RAMPERSAD, P. P.; STEIGERWALD, S.; WIGLE, J. T.; MITCHELL, R. W.; KROEGER, E. A.; GILCHRIST, J. S. C.; MOGHADASIAN, M. M.; LUKAS, A.; PIERCE, G. N. Effects of dietary flaxseed on vascular contractile function and atherosclerosis during prolonged hypercholesterolemia in rabbits. *American Journal Physiological Heart and Circulatory Physiology*. v. 291, n. 6, p. 2987-2996, 2006.
- ELLIS, P. R.; KENDALL, C. W. C.; REN, Y.; PARKER, C.; PACY, J. F.; WALDRON, K. W.; JENKINS, D. J. A. Role of cell walls in the bioaccessibility of lipids in almond seeds. *American Journal of Clinical Nutrition*. v. 80, n. 3, p. 604-613, 2004.

EUFRÁSIO, M. R. *Ação de diferentes tipos de fibras sobre frações lipídicas do sangue e fígado de ratos*. Lavras, 2003, 54p; Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos), Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras (UFLA)

FAINTUCH, J.; HORIE, L. M.; SCHMIDT, V. D.; BARBEIRO, H. V.; BARBEIRO, D. F.; SORIANO, F. G.; CECCONELLO, I. Obesity, inflammation, vascular reactivity, and cardiocirculatory events. *Clinics*. v. 62, p. 357-358, 2007.

FAINTUCH, J.; SCHMIDT, V. D.; HORIE, L. M.; BARBEIRO, H. V. Propriedades anti-inflamatórias da farinha de linhaça em pacientes obesos. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*. v. 21, n. 4, p. 273-277, 2006.

FERNANDEZ, I.; VIDUEIROS, S. M.; PERRIS, P.; PALLARO, A. Effect of flaxseed feeding vs other sources of different protein quality on growth's rats. *FASEB J*. v. 23, n. Meeting Abstracts, p. 732, 2009.

FRANK, J.; ELIASSON, C.; LEROY-NIVARD, D.; BUDEK, A.; LUNDH, T.; VESSBY, B.; ÅMAN, P.; KAMAL-ELDIN, A. Dietary secoisolariciresinol diglucoside and its oligomers with 3-hydroxy-3-methyl glutaric acid decrease vitamin E levels in rats. *British Journal of Nutrition*. v. 92, n. 01, p. 169-176, 2004.

FUKUMITSU, S.; AIDA, K.; UENO, N.; OZAWA, S.; TAKAHASHI, Y.; KOBORI, M. Flaxseed lignan attenuates high-fat diet-induced fat accumulation and induces adiponectin expression in mice. *British Journal of Nutrition*. v. 100, n. 03, p. 669-676, 2008.

GARCIA-DIAZ, D. F.; CAMPION, J.; MILAGRO, F. I.; PATERNAIN, L.; SOLOMON, A.; MARTINEZ, J. A. Ascorbic acid oral treatment modifies lipolytic response and behavioural activity but not glucocorticoid metabolism in cafeteria diet-fed rats. *Acta Physiologica*. v. 195, n. 4, p. 449-457, 2009.

HADDAD, J. Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* v. 316, n. 4, p. 969-77, 2004.

HAQUE, M. R.; BRADBURY, J. H. Total cyanide determination of plants and foods using the picrate and acid hydrolysis methods. *Food Chemistry*. v. 77, n. 1, p. 107-114, 2002.

JACINTO, K. A. *Efeito do consumo de farinha de linhaça (Linum Usitatissimum) no crescimento de ratos wistar e relação com a digestibilidade in vitro e in vivo de globulinas e com o conteúdo de fatores antinutricionais proteicos em albuminas*. Natal, 2007, 73p. Dissertação (Mestre em Bioquímica), Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

JOHNSSON, P. *Phenolic Compounds in Flaxseed*. (2004). 36 f. - Department of Food Science, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala 2004.

- KHAN, G.; PENTTINEN, P.; CABANES, A.; FOXWORTH, A.; CHEZEK, A.; MASTROPOLE, K.; YU, B.; SMEDSD, A.; HALTTUNEN, T.; C GOOD; M'AKEL, S.; HILAKIVI-CLARKE, L. Maternal flaxseed diet during pregnancy or lactation increases female rat offspring's susceptibility to carcinogen-induced mammary tumorigenesis. *Reproductive Toxicology*. v. 23, n. 3, p. 397-406, 2007.
- KINSELLA, J. E.; LOKESH, B.; STONE, R. A. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. *American Journal of Clinical Nutrition*. v. 52, n. 1, p. 1-28, 1990.
- KRANTZ, D. S. A naturalistic study of social influences on meal size among moderately obese and nonobese subjects. *Psychosomatic Medicine*. v. 41, n. 1, p. 19-27, 1979.
- LEI, B.; LI-CHAN, E. C. Y.; OOMAH, B. D.; MAZZA, G. Distribution of Cadmium-Binding Components in Flax (*Linum usitatissimum* L.) Seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 51, n. 3, p. 814-821, 2003.
- LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.
- MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUSMP, S. *Alimentos, Nutrição e Dietoterapia*. 10<sup>a</sup>. ed. São Paulo, 2002.
- MAKNI, M.; FETOUI, H.; GARGOURI, N. K.; GAROUI, E. M.; JABER, H.; MAKNI, J.; BOUDAWARA, T.; ZEGHAL, N. Hypolipidemic and hepatoprotective effects of flax and pumpkin seed mixture rich in [omega]-3 and [omega]-6 fatty acids in hypercholesterolemic rats. *Food and Chemical Toxicology*. v. 46, n. 12, p. 3714-3720, 2008.
- MARGARETO, J.; AGUADO, M.; OSÉS-PRIETO, J. A.; RIVERO, I.; MONGE, A.; ALDANA, I.; MARTI, A.; MARTÍNEZ, J. A. A new NPY-antagonist strongly stimulates apoptosis and lipolysis on white adipocytes in an obesity model. *Life Sciences*. v. 68, n. 1, p. 99-107, 2000.
- MARQUES, A. Y. C. *Propriedades funcionais da linhaça (Linum usitatissimum L.) em diferentes condições de preparo e de uso em alimentos*. Santa Maria, 2008. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos), Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal De Santa Maria (UFSM).
- MEAGHER, L. P.; BEECHER, G. R. Assessment of Data on the Lignan Content of Foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. v. 13, n. 6, p. 935-947, 2000.
- MEDEIROS, D. M.; HAMPTON, M.; KURTZER, K.; PARELMAN, M.; AL-TAMIMI, E.; DROUILLARD, J. S. Feeding enriched omega-3 fatty acid beef to rats increases omega-3 fatty acid content of heart and liver membranes and decreases serum vascular cell adhesion molecule-1 and cholesterol levels. *Nutrition Research*. v. 27, n. 5, p. 295-299, 2007.



MILAGRO, F. I.; CAMPION, J.; MARTINEZ, J. A. Weight Gain Induced by High-Fat Feeding Involves Increased Liver Oxidative Stress[ast]. *Obesity*. v. 14, n. 7, p. 1118-1123, 2006.

MILDER, I. E. J.; ARTS, I. C. W.; PUTTE, B. V. D.; VENEMA, D. P.; HOLLMAN, P. C. H. Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *British Journal of Nutrition*. v. 93, n. 03, p. 393-402, 2005.

MOHORA, M.; GREABU, M.; MUSCUREL, C.; DUȚĂ, C.; TOTAN, A. The sources and the targets of oxidative stress in the etiology of diabetic complications. *Romanian Journal of Biophysics* v. 17, n. 3, p. 63-84, 2007.

MORAES, E. A.; MORAIS, D. C.; DANTAS, M. I. S.; CECON, P. R.; SILVA, C. O.; MARTINO, H. S. D.; CASTRO, F. A.; RIBEIRO, S. M. R. Composição química centesimal da farinha de linhaça. *XVIII SIC*. v. 8, n. 2008, 2008.

MUKHOPADHYAY, N.; SARKAR, S.; BANDYOPADHYAY, S. Effect of extrusion cooking on anti-nutritional factor tannin in linseed (*Linum usitatissimum*) meal. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. v. 58, n. 8, p. 588-594, 2007.

NAVES, A.; PASCHOAL, V. Regulação funcional da obesidade. *Conscientiae Saúde*. v. 6, n. 1, p. 189-199, 2007.

NESBITT, P. D.; LAM, Y.; THOMPSON, L. U. Human metabolism of mammalian lignan precursors in raw and processed flaxseed. *American Journal of Clinical Nutrition*. v. 69, n. 3, p. 549-555, 1999.

NEWAIRY, A.-S. A.; ABDU, H. M. Protective role of flax lignans against lead acetate induced oxidative damage and hyperlipidemia in rats. *Food and Chemical Toxicology*. v. 47, n. 4, p. 813-818, 2009.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*. v.31 (11), p. 1287-1312, 2001.

OLIVEIRA, C. G. *Absorção de Macronutrientes de Energia em Indivíduos Saudáveis após o Consumo de Linhaça e seus Derivados*. Viçosa, 2006, 83p. Dissertação (Mestre em Ciência da Nutrição), Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa.

OOMAH, B. D. Flaxseed as a functional food source†. *Journal of the Science of Food and Agriculture* v. 81, p. 889, 2001.

OOMAH, B. D.; KENASCHUK, E. O.; MAZZA, G. Tocopherols in Flaxseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 45, n. 6, p. 2076-2080, 1997.

OOMAH, B. D.; MAZZA, G. Effect of Dehulling on Chemical Composition and Physical Properties of Flaxseed. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. v. 30, n. 2, p. 135-140, 1997.

OOMAH, B. D.; MAZZA, G. Compositional changes during commercial processing of flaxseed. *Industrial Crops and Products* v. 9, n. 1, p. 29-37, 1998.

OOMAH, B. D.; MAZZA, G. Health benefits of phytochemicals from selected Canadian crops. *Trends in Food Science; Technology*. v. 10, n. 6-7, p. 193-198, 1999.

PAN, A.; SUN, J.; CHEN, Y.; YE, X.; LI, H.; YU, Z.; WANG, Y.; GU, W.; ZHANG, X.; CHEN, X.; DEMARK-WAHNEFRIED, W.; LIU, Y.; LIN, X. Effects of a Flaxseed-Derived Lignan Supplement in Type 2 Diabetic Patients: A Randomized, Double-Blind, Cross-Over Trial. *PLoS ONE*. v. 2, n. 11, 2007.

PAN, A.; YU, D.; DEMARK-WAHNEFRIED, W.; FRANCO, O. H.; LIN, X. Meta-analysis of the effects of flaxseed interventions on blood lipids. *American Journal of Clinical Nutrition*. v. 90, n. 2, p. 288-297, 2009.

PATADE, A.; DEVAREDDY, L.; LUCAS, E. A.; KORLAGUNTA, K.; DAGGY, B. P.; H, A. B. Flaxseed Reduces Total and LDL Cholesterol Concentrations in Native American Postmenopausal Women. *Journal of Women's Health*. v. 17, n. 3, p. 355-366, 2008.

PELLIZZON, M. A.; BILLHEIMER, J. T.; BLOEDON, L. T.; SZAPARY, P. O.; RADER, D. J. Flaxseed Reduces Plasma Cholesterol Levels in Hypercholesterolemic Mouse Models. *Journal of the American College of Nutrition*. v. 26, n. 1, p. 66-75, 2007.

PEREIRA, L. O.; FRANCISCHI, R. P.; LANCHA, J. R. hi Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. . *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*. v. 47, n. 2, p. 111-127, 2003.

POPKIN, B. M. The Nutrition Transition and Obesity in the Developing World. *The Journal Nutrituion*. v. 131, n. 3, p. 871S-873, 2001.

PRADA, P. O.; ZECCHIN, H. G.; GASPARETTI, A. L.; TORSONI, M. A.; UENO, M.; HIRATA, A. E.; COREZOLA DO AMARAL, M. E.; HOER, N. F.; BOSCHERO, A. C.; SAAD, M. J. A. Western Diet Modulates Insulin Signaling, c-Jun N-Terminal Kinase Activity, and Insulin Receptor Substrate-1ser307 Phosphorylation in a Tissue-Specific Fashion. *Endocrinology*. v. 146, n. 3, p. 1576-1587, 2005.

PRASAD, K. Dietary flax seed in prevention of hypercholesterolemic atherosclerosis. *Atherosclerosis*. v. 132, n. 1, p. 69-76, 1997.

PRASAD, K. Secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed delays the development of type 2 diabetes in Zucker rat. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. v. 138, n. 1, p. 32-39, 2001.

- PRASAD, K. Hypcholesterolemic and antiatherosclerotic effect of flax lignan complex isolated from flaxseed. *Atherosclerosis*. v. 179, n. 2, p. 269-275, 2005.
- PRASAD, K. Regression of hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits by secoisolariciresinol diglucoside isolated from flaxseed. *Atherosclerosis*. v. 197, n. 1, p. 34-42, 2008.
- PRASAD, K.; MANTHA, S. V.; MUIR, A. D.; WESTCOTT, N. D. Reduction of hypercholesterolemic atherosclerosis by CDC-flaxseed with very low alpha-linolenic acid. *Atherosclerosis*. v. 136, n. 2, p. 367-375, 1998.
- RALLIDIS, L. S.; PASCHOS, G.; LIAKOS, G. K.; VELISSARIDOU, A. H.; ANASTASIADIS, G.; ZAMPELAS, A. Dietary [alpha]-linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patients. *Atherosclerosis*. v. 167, n. 2, p. 237-242, 2003.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *The Journal Nutrition*. v. 23, n. 11, p. 1939-1951, 1993.
- RIBEIRO, S. M. R.; ABRANCHES, M. V.; DINIZ, D. R.; ESPESCHIT, A. C. R.; PELUZIO, M. C. G.; QUEIROZ, J. H. Q. Efeito pró e antioxidantes dose-dependente de compostos bioativos. *Alimentos Funcionais - Benefícios para a saúde*. Viçosa, 2008. p. 298.
- ROCHA, K. S. O.; SABARENSE, C. M.; ROSA, D. D.; SILVA, M. M. L.; SILVA, F. F. DESIGN AND VALIDATION OF A NEW COMPUTATIONAL METHOD FOR COUNTING HEPATICS FAT MICRO-VESICLES IN HISTOLOGICAL STUDY IN RATS, Article was submitted for analysis. Project in partnership between Department of Agricultural Engineering and Department of Nutrition and Health. University of Viçosa, MG, Brasil, 2008.
- RUSSELL, L. D.; RENATO DE FRANCA, L.; HESS, R.; COKKE, P. Characteristics of mitotic cells in developing and adult tests with observations on cell lineages. *Tissue ; cell* v. 27 n. 1, p. 105-128 1995.
- SAEG Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: *Fundação Arthur Bernardes*. Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, 2007.
- Sigma Stat [computer program]. Version 2,03: Statistical software. SPSS-INC. 1992-97.
- SIMOPOULOS, A. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic disease. *Experimental Biology and Medicine*. v. 233, p. 674-688, 2008.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. 2008.

- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia* 2007; 88: 19.
- SOUZA, L. O.; DOURADO, M. T.; DOURADO, A. S.; ROCHA, A. R.; NASCIMENTO, S. Análise da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), em ratos Wistar após ingestão de chá da semente de *Eugenia jambolana*. *XVII Congresso de Iniciação Científica* Universidade Federal de Pelotas 2008.
- STRANDÅS, C.; KAMAL-ELDIN, A.; ANDERSSON, R.; AMAN, P. Phenolic glucosides in bread containing flaxseed. *Food Chemistry*. v. 110, n. 4, p. 997-999, 2008.
- THRALL, M. A. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. São Paulo, 2007.
- VARGA, T.; DIOSADY, L. Simultaneous extraction of oil and antinutritional compounds from flaxseed. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. v. 71, n. 6, p. 603-607, 1994.
- VETTER, J. Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon*. v. 38, n. 1, p. 11-36, 2000.
- VIJAIMOHAN, K.; JAINU, M.; SABITHA, K. E.; SUBRAMANIYAM, S.; ANANDHAN, C.; SHYAMALA DEVI, C. S. Beneficial effects of alpha linolenic acid rich flaxseed oil on growth performance and hepatic cholesterol metabolism in high fat diet fed rats. *Life Sciences*. v. 79, n. 5, p. 448-454, 2006.
- WANASUNDARA, P. K. J. P. D.; SHAHIDI, F.; BROSNAN, M. E. Changes in flax (*Linum usitatissimum*) seed nitrogenous compounds during germination. *Food Chemistry*. v. 65, n. 3, p. 289-295, 1999.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The world health report 2002 reducing risks, promoting healthy life. Geneva 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guideline for Drinking-Water Quality. In: Water criteria and other supporting information. v. 2. Geneva 2006.
- YANG, H.; MA, Z.; TAN, H. Determination and Removal Methods for Cyanogenic Glucoside in Flaxseed. *Annual International Meeting Ottawa*. v., 2004.
- YUAN, L.-P.; CHEN, F.-H.; LING, L.; DOU, P.-F.; BO, H.; ZHONG, M.-M.; XIA, L.-J. Protective effects of total flavonoids of *Bidens pilosa* L. (TFB) on animal liver injury and liver fibrosis. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 116, n. 3, p. 539-546, 2008.