

MARI UYEDA

**EFEITOS DO ÓLEO DE PEIXE E SEU
CONCENTRADO OBTIDO POR PROCESSO
BIOTECNOLÓGICO NO PERFIL DE ÁCIDOS
GRAXOS HEPÁTICO E NA RESPOSTA DO SISTEMA
OXIDANTE-ANTIOXIDANTE DE RATOS**

Bragança Paulista

2014

MARI UYEDA

**EFEITOS DO ÓLEO DE PEIXE E SEU
CONCENTRADO OBTIDO POR PROCESSO
BIOTECNOLÓGICO NO PERFIL DE ÁCIDOS
GRAXOS HEPÁTICO E NA RESPOSTA DO SISTEMA
OXIDANTE-ANTIOXIDANTE DE RATOS**

Orientadora: Prof. Dr^a. PATRICIA DE OLIVEIRA CARVALHO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós
Graduação Stricto Sensu em Ciências da
Saúde da Universidade São Francisco para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde

Bragança Paulista

2014

Aos meus pais Anita e Cangí Uyeda
por todo carinho, amor, apoio incondicional, sempre.

Ao meu marido Alexandre e às minhas filhas
Ana Laura e Ana Luisa pelo amor, carinho, paciência e incentivo
durante todos esses anos de dedicação aos estudos.

Amo todos vocês.

FOLHA DA ASSINATURA DA BANCA

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido tantas alegrias, possibilidades e oportunidades.

À Prof^a. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho pela sua valiosa orientação, ensinamentos, confiança, paciência e amizade.

Aos meus familiares, por toda oração, carinho, incentivo e pelo apoio nas horas mais difíceis.

A equipe da UNIFESP, representada pela Dra. Karina Barros Munhoz, responsável pelo tratamento dos animais e fornecimento dos tecidos. Graças a vocês, este trabalho foi possível.

Às colegas de laboratório Verônica, Maria Elisa, Yolanda em especial a Marcia Cristina Fernandes Messias por sua paciência, amizade e ajuda durante os momentos mais importantes do meu trabalho.

“ A mente que se abre a uma nova
ideia jamais voltará ao seu
tamanho original”
(Albert Einstein)

RESUMO

Os ácidos graxos poliinsaturados da família n-3 (AGPIs n-3), presentes no óleo de peixe, são incorporados às membranas celulares e influenciam vários processos metabólicos. Apesar dos efeitos benéficos conhecidos, em especial dos ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), poucos estudos avaliaram o efeito destes ácidos, e sua relação com a via de administração, na resposta do sistema oxidante-antioxidante de animais. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação (0.2g/kg/dia por três dias) de óleo de peixe (via enteral) e de emulsão de óleo de peixe (via parenteral) no perfil de ácidos graxos hepático e na resposta do sistema oxidante-antioxidante de ratos. Também foram avaliados animais que receberam óleo de soja, emulsão de óleo de soja e um concentrado de óleo de sardinha (via enteral) com altos teores de EPA e DHA, obtido em laboratório por processo biotecnológico. O perfil de ácidos graxos hepático foi determinado por cromatografia a gás e a oxidação lipídica avaliada através da determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Foi avaliada a atividade hepática das enzimas SOD e CAT e a expressão da $\Delta 6$ -dessaturase (FADS2), enzima envolvida na etapa de dessaturação dos ácidos graxos, por *western blot*. Os resultados mostraram que a suplementação parenteral com emulsão de óleo de peixe levou ao acréscimo de AGPIs n-3 (EPA e DHA) e a redução significativa da razão entre os AGPIs n-6/AGPIs n-3 nos lípides polares e neutros e na expressão de FADS2 do fígado. Com relação à via enteral, o óleo de peixe levou ao acréscimo de EPA nos lípides neutros sem alterar a razão entre as famílias de AGPIs. Os óleos e as emulsões de soja e de peixe não levaram ao aumento da lipoperoxidação e também não foi observada alteração na defesa antioxidante. Por outro lado, a maior incorporação de EPA e DHA nos lípides hepático dos animais que receberam a suplementação com o concentrado de óleo de peixe levou ao aumento nos níveis hepáticos de TBARS, sem alterar a atividade das enzimas antioxidantes. Portanto, o trabalho mostra evidências da utilização segura do óleo e da emulsão de óleo de peixe em curto tempo, e que a suplementação com óleo de peixe concentrado em EPA e DHA, sem a presença de antioxidantes, deve ser cuidadosamente avaliada, e mais estudos são necessários para determinar o efeito dos AGPIs n-3 em altas concentrações e em períodos longos de suplementação.

ABSTRACT

Polyunsaturated fatty acids of the n-3 family (n-3 PUFAs) present in fish oil are incorporated to the cell membranes and influence various metabolic processes. In spite of their well-known beneficial effects, especially those of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), few studies have assessed their effects or that of the form of administration on the response of the oxidant-antioxidant system in animals. This study aims to evaluate the effect of enteral supplementation with fish oil (0.2g/kg/day for three days) and parenteral supplementation with fish oil emulsion on the hepatic fatty acids profile and the oxidant-antioxidant system responses of rats. Other evaluations were made of animals that received soy oil, soy oil emulsion, and a sardine oil concentrate (enteral administration) with high EPA and DHA content, obtained in the laboratory by biotechnology processes. The hepatic fatty acids profiles were determined by gas chromatography and lipid oxidation evaluated by assaying thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The hepatic activity of the enzymes SOD and CAT and that of $\Delta 6$ -desaturase (FADS2), an enzyme involved in the desaturation of fatty acids, were evaluated using western blot. Results showed that parenteral supplementation with fish oil emulsion led to an increase in the n-3 PUFAs (EPA and DHA) and a significant reduction of the n-6 PUFAs/n-3 PUFAs ratio in the polar and neutral lipids and of the FADS2 expression of the liver. In regard to enteral administration, the fish oil led to an increase in EPA in the neutral fatty acids but without altering the ratios among the members of the PUFA families. Neither the fish oil nor the fish oil emulsion led to any increase in lipid peroxidation and no alteration was detected in antioxidant defense. On the other hand the increased incorporation of EPA and DHA in the hepatic lipids of animals supplemented with the fish oil concentrate led to increased hepatic TBARS levels but without altering antioxidant enzyme activity. Thus the research showed evidence of the safe use of fish oil and fish oil emulsion for short periods and that supplementation with fish oil with concentrated EPA and DHA content without the presence of antioxidants needs to be carefully evaluated. Further studies are needed to determine the effects of high concentrations of n-3 PUFAs administered in supplementation for long periods.

LISTA DE ABREVIATURAS

IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
AGPIs	Ácidos graxos poliinsaturados
AA	Ácido araquidônico
DHA	Ácido docosahexaenóico
EPA	Ácido eicosapentaenóico
EROs	Espécies reativas ao oxigênio
IL	Interleucina
TAG	Triacilglicerol
AGL	Ácidos graxos livres
$\Delta 6$	Delta 6 dessaturase
$\Delta 5$	Delta 5 dessaturase
LT	Leucotrieno
LOX	Lipoxigenase
PG	Prostaglandina
TX	Tromboxano
COX	Cicloxygenase
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
CG	Cromatografia a gás
ROO [•]	Radical peroxila
ROOH	Hidroperóxido lipídico
CAT	Catalase
NFkB	Fator de transcrição nuclear
TNF- α	Fator de necrose tumoral
GPX	Glutathiona peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
OH [•]	Radical hidroxil
MDA	Malondialdeído

Lista de Ácidos Graxos:

C8:0	Ácido caprílico
C10:0	Ácido cáprico
C12:0	Ácido láurico
C14:0	Ácido mirístico
C15:0	Ácido pentadecanóico
C16:0	Ácido palmítico
C16:1	Ácido palmitoléico
C17:0	Ácido heptadecanóico
C18:0	Ácido esteárico
C18:1 n-9	Ácido oléico
C18:2 n-6	Ácido linoléico
C18:3 n-6	Ácido gama-linolênico
C18:3 n-3	Ácido alfa-linolênico
C20:1 n-9	Ácido eicosanóico
C20:2 n-6	Ácido eicosadienóico
C20:3 n-3	Ácido eicosatrienóico
C20:3 n-6	Ácido dihomo-gama-linolênico
C20:4 n-6	Ácido araquidônico
C20:5 n-3	Ácido eicosapentaenóico
C22:1 n-9	Ácido erúcico
C22:6 n-3	Ácido docosahexaenóico
C23:0	Ácido tricosanóico
C24:0	Ácido lignocérico
C24:1 n-9	Ácido nervônico

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Nomenclatura descritiva e sistemática dos principais ácidos graxos encontrados na natureza	04
Tabela 2	Sistema de abreviação dos ácidos graxos	05
Tabela 3	Fontes de ácidos graxos pertencentes às famílias n-3 e n-6	07
Tabela 4	Principais efeitos dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 no metabolismo de lípidos e no sistema oxidante-antioxidante de ratos	12
Tabela 5	Resumo das principais defesas antioxidantes no sistema biológico	22
Tabela 6	Informação nutricional do óleo de soja (Liza®)	29
Tabela 7	Informação nutricional da cápsula de óleo de peixe (Naturalis®)	29
Tabela 8	Informação nutricional da emulsão de óleo de soja (Lipovenos®)	30
Tabela 9	Informação nutricional da emulsão de óleo de peixe (Omegaven®)	30
Tabela 10	Composição dos ácidos graxos da fração de lípidos neutros do tecido hepático de animais controle e suplementados com óleo de soja e de peixe (via enteral) e com emulsão de óleo de soja e de peixe (via parenteral)	42
Tabela 11	Composição dos ácidos graxos da fração de lípidos polares do tecido hepático de animais controle e suplementados com óleo de soja e de peixe (via enteral) e com emulsão de óleo de soja e de peixe (via parenteral)	43
Tabela 12	Resposta do sistema oxidante - antioxidante dos animais controle e suplementados com o concentrado de óleo de peixe	50
Tabela 13	Composição de ácidos graxos dos lípidos totais do tecido hepático dos animais controle e suplementados com o concentrado de óleo de peixe	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do ácido α -linolênico (a) e ácido linoléico (b)	05
Figura 2	Etapas bioquímicas para a síntese de ácidos graxos das famílias n-6 e n-3	10
Figura 3	Metabolismo oxidativo do ácido araquidônico e eicosapentaenóico pelo mecanismo da cicloxigenase e lipoxigenase	10
Figura 4	Reações químicas de formação de radicais livres	17
Figura 5	Dismutação do radical superóxido por ação da superóxido dismutase	17
Figura 6	Representação esquemática de dano celular causado por espécies reativas de oxigênio	18
Figura 7	Etapas da lipoperoxidação lipídica	20
Figura 8	Divisão dos animais nos grupos experimentais por via de administração	28
Figura 9	Reação do malondialdeído (MDA) com o tiobarbitúrico (TBA)	33
Figura 10	Curva padrão do tetraetoxipropano	33
Figura 11	Composição dos ácidos graxos do óleo de soja (Liza®)	38
Figura 12	Composição dos ácidos graxos do óleo de peixe (Naturalis®)	38
Figura 13	Composição dos ácidos graxos do concentrado de óleo de peixe	39
Figura 14	Composição dos ácidos graxos da emulsão lipídica de óleo de soja (Lipovenos®)	39
Figura 15	Composição dos ácidos graxos da emulsão lipídica de óleo de peixe (Omegaven®)	40
Figura 16	Composição dos ácidos graxos da mistura de padrões FAME da Supelco	40
Figura 17	Relação entre o conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados da família n-6 e n-3 da fração de lípides polares de animais suplementados com óleo de peixe e de soja pelas vias enteral e parenteral	45

Figura 18	Relação entre o conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados da família n-6 e n-3 da fração de lípidos neutros de animais suplementados com óleo de peixe e de soja pelas vias enteral e parenteral	45
Figura 19	Medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em fígado de ratos dos grupos controle e suplementados com óleo de soja e peixe pelas vias oral e parenteral	46
Figura 20	Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em fígado de ratos dos grupos controle e suplementados com óleo de soja e peixe pelas vias oral e parenteral	47
Figura 21	Atividade da enzima catalase (CAT) em fígado de ratos dos grupos controle e suplementados com soja e peixe pelas vias oral e parenteral	48
Figura 22	Expressão da $\Delta 6$ dessaturase (FADS2) no fígado dos animais controle e suplementados com soja e peixe pelas vias enteral e parenteral	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Ácidos graxos poliinsaturados: nomenclatura e família	03
1.2. Fontes e metabolismo dos ácidos graxos	06
1.3. Efeitos dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 no metabolismo de lípidos e no sistema oxidante-antioxidante	11
1.4. Dessaturases	15
1.5. Radicais livres e espécies reativas	16
1.6. Estresse oxidativo	18
1.7. Lipoperoxidação	20
1.8. Sistema de defesa antioxidante	22
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. METODOLOGIA	26
3.1. Preparo do concentrado do óleo de peixe	26
3.2. Animais e tratamento	26
3.3. Coleta de amostras	31
3.4. Extração dos lípidos totais	31
3.5. Separação dos lípidos por extração em fase sólida	31
3.6. Determinação do perfil de ácidos graxos por cromatografia a gás	32
3.7. Medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	32
3.8. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)	34
3.9. Determinação da catalase (CAT) e proteínas totais	34
3.10. Análise da expressão da enzima $\Delta 6$ -dessaturase (FADS2)	35
3.11. Análise estatística	36
4. RESULTADOS	37
4.1. Composição de ácidos graxos dos óleos e emulsões usados na	37

suplementação dos animais	
4.2. Composição de ácidos graxos dos lípidos polares e neutros do fígado de animais	41
4.3. Medida de lipoperoxidação hepática pelo índice TBARS	46
4.4. Atividade hepática das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)	47
4.5. Expressão proteica da $\Delta 6$ -dessaturase hepática (FADS2)	48
4.6. Resposta do sistema oxidante/ antioxidante dos animais suplementados com o concentrado de óleo de peixe	50
4.7. Resposta do sistema oxidante/ antioxidante dos animais suplementados com o concentrado de óleo de soja	51
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÃO	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

A importância na dieta dos ácidos graxos poliinsaturados da família n-3 (AGPIs n-3), em especial dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) oriundos do óleo de peixe, tem sido evidenciada desde a década de 80, basicamente pela sua conversão em eicosanóides bioativos: prostaglandinas (PGE), leucotrienos (LT), tromboxanos (TXA) e outros derivados oxidados (Yaquob; Calder, 2007). Além destes, novos grupos de mediadores lipídicos, as resolvinas e protectinas, são biossintetizadas a partir dos AGPIs n-3. Estas são consideradas moléculas endógenas pró-resolução, pois promovem absorção e eliminação de microrganismos e células apoptóticas pelos macrófagos nos locais de inflamação (Calder, 2011).

Além da dieta, os AGPIs, também chamados de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, podem ser originados a partir da metabolização dos ácidos graxos essenciais: ácido linoléico (18:2 n-6) e ácido alfa-linolênico (18:3 n-3). O primeiro é o precursor dos AGPIs da família n-6, como o ácido araquidônico (AA, 20:4 n-6) e o segundo dos AGPIs da família n-3 da qual pertencem o EPA (20:5 n-3) e o DHA (22:6 n-3). Estes ácidos são formados na maioria dos tecidos do organismo por uma série de reações alternadas de dessaturação (adição de duplas ligações, catalisada pela enzima dessaturase) e de alongação (adição de duas unidades de carbono catalisada pela enzima elongase). Nos mamíferos, as dessaturases são capazes de introduzir duplas ligações nas posições $\Delta 5$, $\Delta 6$ e $\Delta 9$, sendo que as enzimas $\Delta 5$ e $\Delta 6$ atuam na dessaturação dos AGPI enquanto a $\Delta 9$ atua na síntese dos ácidos graxos monoinsaturados (Perini *et al*, 2010).

Assim, os ácidos graxos das famílias n-3 e n-6 competem pelas mesmas enzimas envolvidas nas reações de dessaturação e alongação, sendo que essas tem maior afinidade pelo ácido graxo n-3 (Perini *et al*, 2010). O consumo de óleo de peixe leva a incorporação dos AGPIs n-3 nas membranas celulares, reduzindo a disponibilidade de AA (Fetterman e Zdanowicz, 2009; Calder, 2010). O EPA, assim como o AA, também é substrato para as enzimas ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX), podendo levar a produção de eicosanóides. Os eicosanóides derivados do EPA apresentam, normalmente, atividade biológica menor do que àqueles produzidos a partir do AA (Britton, 1995; Calder, 2011). A ingestão de

elevadas quantidades de AGPIs n-3 diminui a capacidade de síntese de eicosanóides derivados do AA, com concomitante aumento na síntese de PGE e TXA da série 3 e LT da série 5, que são menos inflamatórios do que os derivados do AA (Calder *et al* 1996). Por outro lado, o excesso de AGPI n-6, pode contribuir para uma superprodução de PGE₂, TXA₂ e LTB₄, que são potentes mediadores pró-inflamatórios.

Estudos clínicos têm demonstrado diversos efeitos benéficos da suplementação de óleo de peixe em doenças cardiovasculares, inflamatórias, autoimunes, esclerose múltipla e certos tipos de câncer (Innis *et al* 2006, Simopoulos *et al* 2002, Harbige *et al* 1998, Calder 2009).

Embora bem descrita na literatura a importância dos AGPIs n-3 na dieta, sua relação com a lipoperoxidação lipídica e com os mecanismos de defesa antioxidante não estão bem estabelecidos. Os AGPIs são propensos à oxidação, resultando na formação de produtos como alcanos, aldeídos, álcoois e hidroperóxidos além de, epóxidos, cetonas e ácidos (Dormandy, 1994). A proteção dos lípides frente à degradação oxidativa é garantida pelos antioxidantes, sejam os endógenos ou aqueles obtidos da dieta. Enzimas como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase, juntamente com antioxidantes da dieta, constituem a principal defesa do organismo contra danos oxidativos (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Considerando que os AGPIs são importantes substratos para a oxidação lipídica, nossa proposta foi avaliar o efeito da suplementação com óleo de peixe (0,2g/Kg/dia), administrado pelas vias enteral e parenteral em período de tempo curto (3 dias), sobre a incorporação dos ácidos graxos de interesse nos lípides hepáticos e sua influência nos níveis de lipoperoxidação lipídica e na defesa antioxidante de ratos. Os mesmos efeitos foram avaliados em animais que receberam óleo de soja pelas vias enteral e parenteral e em um grupo de animais suplementados com um concentrado obtido por hidrólise enzimática do óleo de sardinha para aumentar os níveis de EPA e DHA. Além disto, foi avaliada a expressão da enzima $\Delta 6$ -dessaturase (FADS2), a principal enzima responsável pela síntese dos AGPIs, o que contribuirá para avaliar a relação entre a influência da dieta na biossíntese desses compostos.

1.1. Ácidos graxos poliinsaturados - nomenclatura e família

A nomenclatura dos ácidos graxos é feita pela substituição do sufixo O do hidrocarboneto com o mesmo número de carbonos na cadeia, pelo sufixo “oico”. Os ácidos graxos com 2 a 6 átomos de carbono são considerados ácidos graxos de cadeia curta ou voláteis; de C6 a C12, cadeia média e C14 a C24 de cadeia longa (Gunstone, 1996). Na Tabela 1 encontra-se nomenclatura dos principais ácidos graxos presentes na natureza.

Os ácidos graxos geralmente representados por símbolos numéricos, tais como: ácido oléico C18:1(9); ácido linoléico, C18:2(9,12); ácido linolênico, C18:3(9,12,15); onde o número justaposto ao símbolo C indica o número de átomos de carbono e o segundo número a quantidade de duplas ligações (DeFilippis, Sperling 2006). A presença de duplas ligações nesta cadeia permite separá-los em saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (mais de uma dupla ligação). A posição da dupla ligação na cadeia carbônica é indicada entre parêntesis, pela identificação do átomo de carbono mais próximo da carboxila, implicado na respectiva insaturação (Ruxton *et al* 2004). Estes ácidos podem ser abreviados conforme ilustra a Tabela 2.

O ácido linolênico e o ácido linoléico são considerados ácidos graxos essenciais ao humano, uma vez que não podem ser metabolizados e, portanto devem ser fornecidos pela dieta, além de serem precursores de outros AGPIs. As estruturas e nomenclatura oficial (determinada pela IUPAC) estão mostradas na Figura 1.

A elongação e a dessaturação dos ácidos linoléico e linolênico formam importantes AGPIs, como o EPA e o DHA, provenientes do ácido linolênico e o AA proveniente do ácido linoléico. Os AGPIs podem ser divididos em famílias ou séries dependendo da localização da última dupla ligação em relação ao seu grupamento metílico terminal: família ômega-9 (9 ou n-9) representada pelo ácido oléico, família ômega-6 (6 ou n-6) representada pelo ácido linoléico e a família ômega-3 (3 ou n-3) representada pelo ácido linolênico.

Tabela 1. Nomenclatura descritiva e sistemática dos principais ácidos graxos encontrados na natureza.

Nome descritivo	Nome sistemático	Átomos de carbono	Ligações duplas	Posição	Família
Láurico	Dodecanóico	12	0		
Mirístico	Tetradecanóico	14	0		
Palmítico	Hexadecanóico	16	0		
Palmitoléico	Hexadecenóico	18	1	9	ω -7
Esteárico	Octadecanóico	18	0		
Oléico	Octadecenóico	18	1	9	ω -9
Linoléico	Octadecadienóico	18	2	9,12	ω -6
Linolênico	Octadecatrienóico	20	3	9,12,15	ω -3
Homo gama linolênico	Eicosatrienóico	20	3	8,11,14	ω -6
Araquidônico	Eicosatetraenóico	20	4	5,8,11,14	ω -6
EPA	Eicosapentaenóico	20	5	5,8,1,14,17	ω -3
DHA	Docosaheptaenóico	22	6	4,7,10,13, 16,19	ω -3

Fonte: Curi *et al*, 200

Tabela 2. Sistema de abreviação dos ácidos graxos

Nome descritivo	Sistema de abreviação			
	Numérico	D	N	Ω
Ácido oléico	18:1 (9)	18:1 D9	18:1 n-9	18:1 ω 9
Ácido linoléico	18:2 (9,12)	18:2 D9,12	18:2 n-6	18:2 ω 6
Ácido alfa linolênico	18:3 (9,12,15)	18:3 D9,12,15	18:3 n-3	18:3 ω 3

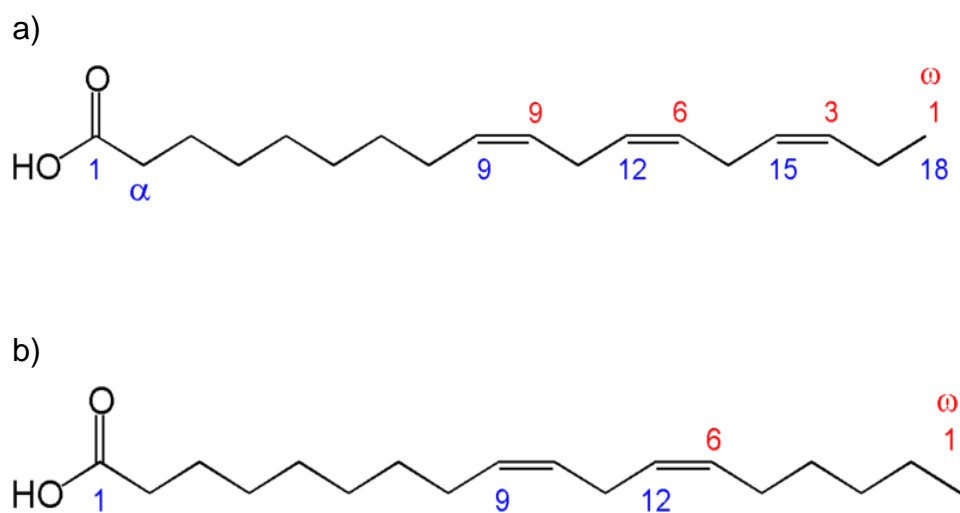


Figura 1. Estrutura do ácido α-linolênico (a) e ácido linoléico (b)

1.2. Fontes e metabolismo dos ácidos graxos

A dieta humana contém vários tipos de ácidos graxos, consumidos em diferentes quantidades, de acordo com padrões e escolhas alimentares. Alguns desses ácidos graxos são considerados essenciais pelo fato de o homem não conseguir produzi-los em seu organismo, devendo, portanto, ser consumidos na dieta.

A maioria dos ácidos graxos ingeridos corresponde às gorduras saturadas, bem como monoinsaturadas e, quantidades modestas de AGPIs (Benatti *et al*, 2004). A principal fonte de ácidos graxos n- 6 são óleos vegetais (como óleo de soja), enquanto peixe e outros óleos vegetais (como óleo de linhaça) representam importante fonte de AGPIs n- 3. A Tabela 3 mostra algumas das principais fontes de AGPIs da série n-6 e n-3.

A composição de TAGs de óleos de peixes marinhos é complexa devido ao grande número de ácidos graxos altamente insaturados de cadeia longa. Os principais ácidos graxos saturados presentes em óleo de peixe são o palmítico (C16:0) e o mirístico (C14:0). Os ácidos graxos monoinsaturados compreendem principalmente o ácido palmitoléico (C16:1 n-7), o ácido oléico (C18:1n-9) e seu isômero ácido *cis*- vacênico (C18:1 n-7), além do ácido eicosenóico (C20:1n-9) e ácido cetoléico (C22:1 n-11). Na carne e no óleo de fígado de peixes, os principais AGPI são o EPA e o DHA que chegam a representar 15 - 30% dos ácidos graxos totais (Lands, 2005). Num estudo sobre a distribuição dos ácidos graxos nos TAGs, sugere-se que existe um AGPI ocupando a posição 2 e frequentemente um monoinsaturado (C16:1 ou 18:1) na posição 1, sendo que os ácidos graxos monoinsaturados de cadeia muito longa tendem a ocupar a posição 3 (Brockerhoff *et al*, 1969).

Os principais ácidos graxos saturados presentes no óleo de soja são o mirístico (C14:0), palmítico (C16:0). Os ácidos graxos monoinsaturados compreendem principalmente o ácido palmitoléico (C16:1 n-7), o ácido esteárico (C18:0), oléico (C18:1n-9), ácido linoléico (C 18:2 n-6) e alfa linolênico (C18:3n-3).

Tabela 3. Fontes de ácidos graxos pertencentes às famílias n-3 e n-6.

Ácidos Graxos %						
Fonte	Linoléico	Araquidônico	Linolênico	EPA	DHA	Ácidos graxos saturados
Predominante n-6						
Óleo de milho	57,0	-	1,0	-	-	13,0
Óleo de girassol	55,0	-	0,3	-	-	10,0
Óleo de amendoim	29,0	-	1,0	-	-	19,0
Predominante n-3						
Óleo de linhaça	15,0	-	55,0	-	-	13,0
Óleo de fígado de bacalhau	2,0	-	1,0	12,0	12,0	19,0
Óleo de arenque	2,0	1,0	1,0	13,0	8,0	32,0
Óleo de cavala	2,0	2,0	1,0	10,0	16,0	35,0
Ambos n-6 e n-3						
Óleo de soja	51,0	-	7,0	-	-	15,0
Óleo de colza	22,0	-	11,0	-	-	8,0
Baixo de n-6 e n-3						
Manteiga	2,0	-	1,0	-	-	62,0
Leite Materno	7,0	0,2	0,7	0,6	0,3	50,0
Banha de porco	10,0	-	1,0	-	-	36,0
Sebo	4,0	-	0,5	-	-	48,0
Gema de ovo	11,0	6,0	0,2	-	-	53,0
Azeite de oliva	8,0	-	0,7	-	-	14,0
Azeite de dendê	9,0	-	0,3	-	-	48,0

Fonte: Minazzi-Rodrigues e Penteadó (1991)

A metabolização dos AGPIs ocorre no retículo endoplasmático hepático por ação de enzimas alongases e dessaturases (Arterbum *et al*, 2006; Schimitz e Ecker, 2008). O EPA e o DHA são sintetizados a partir do precursor ácido α -linolênico, enquanto o AA é sintetizado a partir do ácido linoléico (Ruxton, Reed *et al* 2007). Na conversão final do ácido α -linolênico em DHA é necessário uma translocação ao peroxissomos para uma reação oxidativa, devido a ausência da Δ^4 - dessaturase nos mamíferos (Meyer, Kirsch *et al*, 2004; Arterbum, *et al*, 2006), conforme mostrado na Figura 2.

Eicosanóide é o nome dado a uma grande família de ácidos graxos de vinte carbonos oxigenados e que se divide em três grupos, os prostanóides (prostaglandinas e tromboxanos) gerados através da via da enzima ciclooxigenase (COX), os leucotrienos formados pela via da lipooxigenase (LOX) e os epóxidos gerados pela via do citocromo P450 (Smith, 1989; Basu, 2010).

Os ácidos graxos n-6 originam prostanóides da série 2 e leucotrienos da série 4 que apresentam características pró-inflamatórias, enquanto os ácidos graxos n-3 dão origem a prostanóides da série 3 e leucotrienos da série 5 com propriedades anti-inflamatórias. Assim, o alto consumo de ácidos graxos n-6 resulta em desordens imunológicas, doenças inflamatórias e cardiovasculares, sendo recomendável o maior consumo de ácidos graxos da família n-3 (Martin *et al*, 2006, Manku *et al*, 1988).

Além de seus efeitos anti-inflamatórios mediados pela menor produção de eicosanóides pró-inflamatórios, os AGPIs n-3 também agem controlando o processo inflamatório por modular a expressão de moléculas de adesão, tais como selectinas e VCAM-1 (molécula de adesão da célula vascular), que participam nas interações dos neutrófilos com o endotélio vascular. Isto é conseguido através da modulação das vias de sinalização associadas com o fator de transcrição nuclear κ B (NF κ B). Ácidos graxos n-3 podem agir também diretamente em receptores nucleares, como o receptor retinóide X, que opera como fator de transcrição. Ainda, monócitos cujas membranas são enriquecidas com AGPIs n-3 produzem quantidades reduzidas de citocinas, tais como TNF- α e interleucina 1 β , que agem aumentando a resposta inflamatória (Calder, 2010; Surette, 2008).

Portanto, com relação aos efeitos antiinflamatórios dos ácidos graxos n-3 podemos considerar que diminuem o conteúdo de AA das membranas resultando

em síntese de eicosanóides derivados de n-6 diminuída (Giugliano *et al*, 2006), pois a incorporação de ácidos graxos n-3 na membrana celular ocorre com concomitante substituição de AA pelo EPA ou DHA, portanto menos substrato está disponível para produção de eicosanóides (como PGE2, TXA2 e LT4), já que esses últimos são produzidos a partir do AA (Brown, 2000; Lombardo e Chicco, 2006). Dessa forma, ocorre uma competição entre EPA e AA para a síntese de leucotrienos e prostaglandinas em nível de COX e LOX (Fischer, 1989; Vaughan, 2013).

A obtenção de eicosanóides parece ser fácil, pela simples ingestão dos ácidos linoléico e alfa-linolênico, uma vez que o próprio metabolismo do organismo se encarregaria das transformações restantes. Entretanto este processo tem como etapa crucial a enzima $\Delta 6$ -dessaturase a qual, além de insuficiente em humanos pode ser inibida por fatores como o baixo consumo de proteínas, envelhecimento, diabetes, álcool, problemas nutricionais como deficiência de piridoxina, zinco, magnésio, biotina e cálcio e também pelo colesterol (Kinsella, 1991). Nessas condições de ineficiência orgânica de dessaturases é necessária a suplementação de AGPIs. A administração direta dos metabólitos ativos apresenta a vantagem de eliminar a etapa limitante ($\Delta 6$ -dessaturase) no metabolismo de AGPIs, demonstrando efeitos favoráveis quando testados em animais de laboratório e no homem (Masuev, 1997).

A enzima $\Delta 6$ -dessaturase participa tanto da metabolização do ácidos linoléico como do ácido alfa-linolênico (Schimitz e Ecker, 2008). A dieta rica em ácido linoléico reduz a conversão do ácido alfa-linolênico nos seus derivados em torno de 40% (Arterbum *et al*, 2006).

A Figura 3 mostra o metabolismo oxidativo do ácido araquidônico e eicosapentaenóico pelo mecanismo da ciclooxigenase e 5-lipoxigenase com a formação de diferentes classes de tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos (Benatti *et al*, 2004).

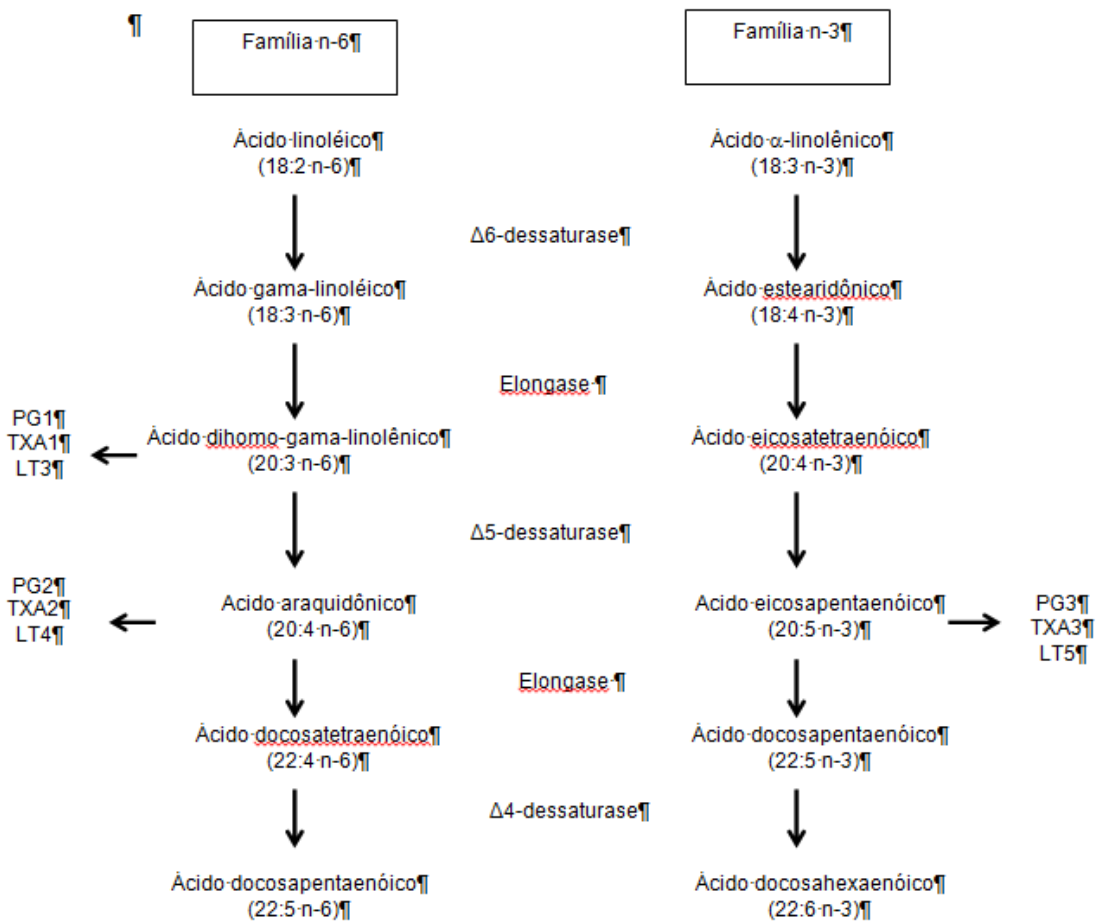


Figura 2. Etapas bioquímicas para a síntese de ácidos graxos das famílias n-3 e n-6. PG1: Prostaglandina série 1; PG2: Prostaglandina série 2; PG3: Prostaglandina série 3; TXA1: Tromboxano série 1; TXA2: Tromboxano série 2; TXA3: Tromboxano série 3; LT3: Leucotrieno série 3; LT4: Leucotrieno série 4; LT5: Leucotrieno série 5

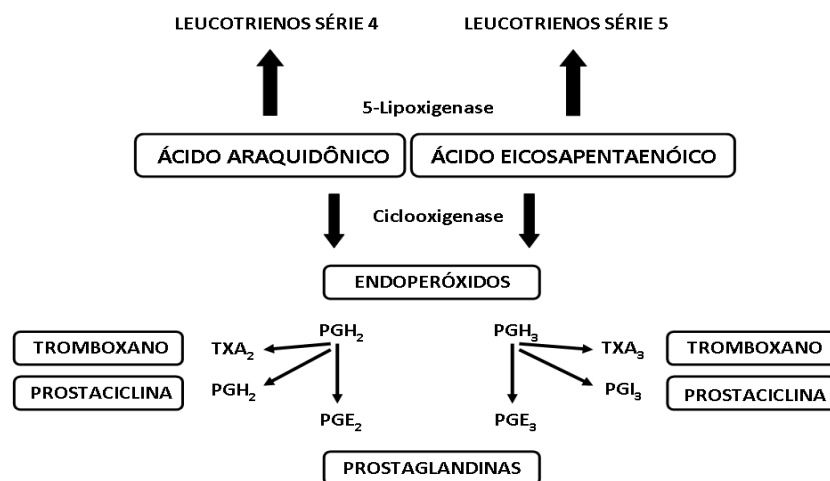


Figura 3. Metabolismo oxidativo do ácido araquidônico e eicosapentaenóico pelo mecanismo da ciclooxygenase e 5-lipoxigenase (adaptado de Simopoulos, 2003).

1.3. Efeitos dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 no metabolismo de lípidos e no sistema oxidante-antioxidante

Os ácidos graxos n-3 têm demonstrado efeitos benéficos no que diz respeito a problemas relacionados a atividade antitrombótica, antiarrítmica e propriedades vasodilatadoras e hipolipidêmica (Giugliano *et al*, 2006; Lombardo e Chicco, 2006).

Os ácidos graxos n-3 também podem atuar na expressão gênica de receptores nucleares que direta ou indiretamente modulam os genes envolvidos no metabolismo de lípidos (Levy e Clore, 2004; Schimitz e Ecker, 2006). Os AGPI n-3 suprimem genes lipogênicos e glicolíticos, como a glicoquinase, complexo da piruvato desidrogenase, acetilCoa carboxilase, piruvato quinase e ácido graxo sintase, e aumentam a codificação de genes relacionados à oxidação lipídica e termogênese ocasionando maior expressão de proteínas tais como carnitina-palmitoil-transferase, HMG-CoA sintase, transportadores de ácidos graxos e acilCoA sintase, incluindo o gene UCP-3 (Clarke, 2000).

Experimentos com animais demonstram o papel dos AGPIs n-3 na regulação da síntese e oxidação de lípidos (Kramer *et al*, 2003) e apresentam efeitos benéficos em indivíduos portadores de doenças do coração, hipertensão, diabetes tipo 2, doença renal, artrite reumatoide, colite ulcerativa, doença de Chron e doença pulmonar obstrutiva crônica (Ruxton, 2007).

Os AGPIs n-3 são capazes de induzir várias alterações bioquímicas benéficas ao indivíduo diabético, como redução do TAG plasmático e aumento nas concentrações de HDL. Estes ácidos graxos são considerados potentes ativadores de PPARs (receptores ativados por proliferadores peroxissomos), que por sua vez, controlam a expressão de genes envolvidos no metabolismo da glicose e na adipogênese (Lombardo e Chicco, 2006).

A Tabela 4 mostra alguns efeitos dos AGPI n-3 no metabolismo de lípidos e no sistema oxidante-antioxidante avaliados em animais.

Tabela 4: Alguns efeitos dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 no metabolismo de lípidos e no sistema oxidante-antioxidante de ratos

Referência	Dieta/suplementação	Principais efeitos observados
Melo <i>et al</i> , 2010	Alimentação balanceada (dieta normolipídica) composta de 4% de lípidos, 21% de proteínas e 62% de carboidratos. PUFA ômega-3 ou PUFA ômega-6 Via intraperitoneal, dose de 0,1g/kg/dia por 14 dias	Ômega 6: Não interferiu na evolução da regeneração hepática e induziu o aumento da peroxidação lipídica (aumento de TBARS no plasma e fígado) , Ômega-3: Inibiu a regeneração hepática e não alterou os níveis de TBARS. Decréscimo de glutathiona reduzida hepática e plasmática
Campos <i>et al</i> , 2011	Suplementação da dieta com: 100 µL de ômega 3 (DHA + EPA), 200 µL de ômega 3 (DHA + EPA) ou 100 µL de ácido oleico por 21 dias	Redução nos níveis plasmáticos de triacilglicerol, colesterol e frações e malondialdeído no plasma e cérebro em ambas as doses administradas e nos três grupos suplementados.
Anschau e Laguer, 2011	Suplementação da dieta com óleo de peixe ou óleo de fígado de tubarão 2g/kg/dia de peso corporal por 4 semanas	Não houve diferença estatística entre a concentração de hidroperóxidos lipídicos nos tecidos analisados (tecidos adiposo, renal e hepático) dos dois grupos.
Popovic <i>et al</i> , 2012	Suplementação da dieta com 200 µL de óleo de peixe (45 mg EPA + 30 mg de DHA) por 6 semanas	Diminuição dos níveis de AA e da relação AGPI n-6/n-3 nos fosfolípidos do plasma. Redução da concentração de TAG e LDL colesterol. Redução da peroxidação lipídica (LPO), a atividade da CAT e concentração de nitritos.
Arisue <i>et al</i> , 2012	Dieta balanceada (normolipídica) contendo óleo de soja ou óleo de peixe (260 ml/Kg/dia) Pela via parenteral em ratos com isquemia-reperfusão por 3 dias	Redução da gravidade dos danos hepáticos e redução dos níveis de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (marcador de estresse oxidativo) na urina nos ratos com isquemia-reperfusão

Muralidhara <i>et al</i> , 2012.	Animais tratados com ácido 3-nitropropiónico (indutor do estresse oxidativo) Dieta balanceada contendo óleo de peixe (2 mL/kg) puro ou adicionado de quercetina (25mg/kg) por 14 dias.	Normalização dos níveis de marcadores de estresse oxidativo (malondialdeído e óxido nítrico) no cérebro somente no grupo óleo de peixe adicionado de quercetina
Ashtiyani <i>et al</i> , 2012.	Suplementação da dieta com óleo de peixe administrado por gavagem. 0,4 g/Kg durante 13 dias	A redução da taxa de filtração glomerular induzida pela reperfusão foi melhorada. Diminuição da excreção de sódio e potássio. Redução dos danos hepáticos decorrentes do estresse oxidativo.
<u>Avramovic</u> <i>et al</i> , 2012	Suplementação da dieta com óleo de peixe (30mg EPA + 45mg DHA/dia) por 6 semanas em animais idosos (24 meses)	Redução da lipoperoxidação (TBARS) e aumento dos níveis de SOD na córtex cerebral.
Yi <i>et al</i> , 2012	Suplementação da dieta com óleo de soja, óleo de peixe ou ácido linoléico conjugado na forma de ésteres metílicos 40g/Kg por 270 dias.	Redução dos níveis de AA, de COX-2 e da síntese de PGE(2) e PGF(2 α) nos fosfolípidos das células do ovário dos animais que receberam óleo de peixe.
Vigerust <i>et al</i> , 2012.	Suplementação da dieta hiperlipídica (25% p/v) com óleo de peixe puro (10% p/v) ou adicionado de um ácido graxo sintético (ácido tetradeciltioacético – TTA) por 50 semanas	O óleo de peixe associado ao TTA reduziu os níveis de colesterol plasmático e a síntese de ácidos graxos. Foi observado aumento do estresse oxidativo no grupo suplementado com óleo de peixe e redução dos marcadores de oxidação (biomarcadores de oxidação de proteínas e lipoperoxidação) no plasma no grupo suplementado com óleo de peixe adicionado de TTA.

Barros <i>et al</i> , 2013.	Suplementação da dieta com óleo de soja ou óleo de peixe pelas vias enteral e parenteral. 0,2g/Kg/dia durante 3 dias consecutivos (dieta normolipídica)	Aumento dos níveis de EPA nos fosfolípides plasmáticos e no fígado dos animais que receberam óleo de peixe (via enteral) comparado ao controle. A administração intravenosa de óleo de peixe aumentou os níveis de EPA e DHA nos fosfolípides plasmáticos, nos leucócitos e fígado de animais comparado ao controle e ao grupo de recebeu emulsão de óleo de soja.
Feillet-Coudray <i>et al</i> , 2013	Grupos suplementados com mistura de óleos contendo banha de porco ou óleo de peixe (dieta hiperlipídica) Dieta com 50 ou 300 g de lípides/kg por 12 semanas	Animais que receberam 30% de lípides desenvolveram esteatose hepática, e àqueles suplementados com 30% de gordura de porco também desenvolveram resistência a insulina e obesidade. Óleo de peixe não foi eficiente em evitar o desenvolvimento da esteatose e levou ao aumento da lipoperoxidação no músculo e fígado dos animais.
Bargut <i>et al</i> , 2014	Dieta padrão (normolipídica) com óleo de soja (40g/kg), dieta padrão com óleo de peixe (36g/kg), dieta hiperlipídica com banha de porco (238 g/kg) ou hiperlipídica com óleo de peixe (238g/Kg) por 8 semanas	A dieta hiperlipídica com banha de porco levou ao desenvolvimento de obesidade, síndrome metabólica, resistência à insulina e esteatose, enquanto o grupo com óleo de peixe manteve os parâmetros similares ao controle. A dieta com alta concentração de óleo de peixe reduziu a lipogênese e aumentou a beta oxidação.
Saidi <i>et al</i> , 2014	Suplementação da dieta normolipídica com óleo de peixe por 3 semanas em ratos com isquemia-reperusão	Redução dos níveis de CAT, SOD e GPx e de TBARS no fígado dos animais tratados com óleo de peixe.

1.4. Dessaturases

Dessaturases de ácidos graxos (FADS) são enzimas que convertem uma ligação simples (CC) a uma dupla ligação (C=C) entre dois átomos de carbono na cadeia de ácidos graxos, como por exemplo nas posições $\Delta 6$, $\Delta 9$ ou $\Delta 12$ (Cossins *et al*, 2002), e comprovadamente estão presentes em todos os grupos de organismos (Los e Murata, 1998). As enzimas $\Delta 5$ e $\Delta 6$ atuam na dessaturação dos AGPIs, enquanto a $\Delta 9$ -dessaturase atua na síntese dos ácidos graxos monoinsaturados.

A estearoil-CoA $\Delta 9$ dessaturase, a dessaturase mais estudada, age acrescentando uma insaturação entre os carbonos 9 e 10 da cadeia de ácidos graxos, sendo que essa enzima age em conjunto com acil-transferases específicas que posicionam esses ácidos graxos modificados nos fosfolípídeos (Polley *et al*, 2003). As acil-CoA são expressas de forma mais efetiva no retículo endoplasmático de animais e respondem a diversos estímulos endógenos e exógenos (Trueman *et al*, 2000).

Polley *et al* (2003) demonstraram que carpas apresentam a expressão de 2 isoformas de estearoil-CoA $\Delta 9$ dessaturase (SCD), sendo que cada uma delas responde a um tipo de estímulo específico, a SCD1 aparece como sendo associada à dietas enriquecidas com ácidos graxos saturados enquanto que a SCD2 apresenta aumento da expressão gênica em resposta a mudanças na temperatura ambiental.

Nos mamíferos os ácidos de até 16 átomos de carbono são sintetizados pela enzima ácido graxo sintase, pela síntese de novo, em quatro etapas. Inicia com a alongação de um grupo primário (acetil ou propionil) com duas unidades de carbono doados a partir do malonil – CoA e o NADPH é utilizado como agente redutor na reação de alongação. Essa reação é repetida sete vezes em forma cíclica para que a enzima sintetize o ácido palmítico (16:0) (Jacobsson *et al*, 2006).

1.5. Radicais livres e espécies reativas

O termo radical livre refere-se a um átomo ou molécula que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, podendo ser formados pela adição ou perda de um elétron de uma substância não radical. Este não emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas (Drôge, 2002).

Assim, as denominadas, de maneira mais geral, espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas capazes de reagir no organismo e conseqüentemente interferir nos processos biológicos e fisiológicos. Eles podem causar danos por reagirem com diversas biomoléculas, removendo elétrons para manter sua estabilidade (Drôge, 2002; Ferreira e Matsubara, 1997). As EROs geralmente tem curta duração de vida e sua recombinação química é quase imediata por ter forte tendência para estabilizar sua órbita externa, captando um elétron de outro átomo ou molécula (Rice-Evans e Burdon, 1993).

Todos os organismos aeróbicos são expostos a EROs, ânions superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxil (OH^{\cdot}) contra as quais desenvolveram mecanismos de proteção (Pal e Uday, 2012). Em condições fisiológicas, os radicais livres encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (Pal e Uday, 2012). No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lípides de membrana e agressão às enzimas, carboidratos e DNA (Barreiros e David, 2006).

Uma fonte importante de radicais livres é a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial sendo seu principal sítio de formação o complexo citocromo b-ubiquinona. Na mitocôndria, a citocromo oxidase promove a redução completa de uma molécula de oxigênio em uma molécula de água e, para isso são necessários quatro elétrons e quatro prótons. Contudo nem sempre o oxigênio origina água diretamente. Como conseqüência de sua configuração eletrônica, a molécula de oxigênio tem forte tendência em receber um elétron de cada vez formando uma série de intermediários,

tais como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este último não possui elétrons livres, portanto não é um radical livre, no entanto é classificado como uma ERO.

O ânion superóxido é o primeiro intermediário formado a partir da redução incompleta do oxigênio molecular na formação da água, e a partir dele podem se formar outras EROs, conforme mostrado na Figura 4. O H_2O_2 é uma molécula muito reativa e pode ser precursora de radicais OH^{\cdot} na presença de metais de transição (Muehlmann *et al*, 2010).

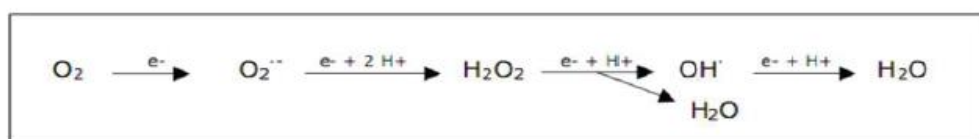


Figura 4. Reações químicas de formação de radicais livres

Em condições fisiológicas o H_2O_2 é formado na mitocôndria em função da atividade metabólica e é gerado a partir do superóxido por meio da dismutação, sendo esta reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) como mostra a Figura 5. (Fridovich, 1975). Tem sido mostrado que, em alguns órgãos, a atividade celular leva a formação de H_2O_2 , pelos peroxissomos (Chance *et al*, 1979). Existe três isoformas da SOD presente na matriz mitocondrial que pode ser dependente de manganês (MnSOD), cobre (CuSOD) ou zinco (ZnSOD).

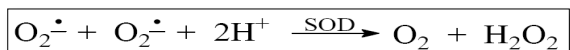


Figura 5. Dismutação do radical superóxido por ação da superóxido dismutase.

Ainda que os radicais livres de O_2 representem um dos mecanismos de defesa do organismo durante uma injúria, já que causam a lise bacteriana, um excesso na produção dessas espécies reativas produz danos pelo estresse oxidativo (Muehlmann *et al*, 2010), o qual pode provocar dano mitocondrial e morte celular (Liu *et al*, 1997).

1.6. Estresse oxidativo

O desequilíbrio entre os mecanismos que causam condições oxidativas e das defesas antioxidantes celulares presentes nos organismos vivos, provoca uma variedade de mudanças fisiológicas, chamadas coletivamente de estresse oxidativo (Petean *et al*, 2007; Barreiros e David, 2006), onde as EROs podem estar aumentadas sem o concomitante aumento das defesas; as proteções podem estar reduzidas sem o aumento daquelas; ou a situação mais crítica, onde o aumento da concentração das EROS vem acompanhado de uma redução paralela das defesas correspondentes (Amstad e Cerutti, 1990). A Figura 6 mostra a representação de um dano celular causado por EROs.

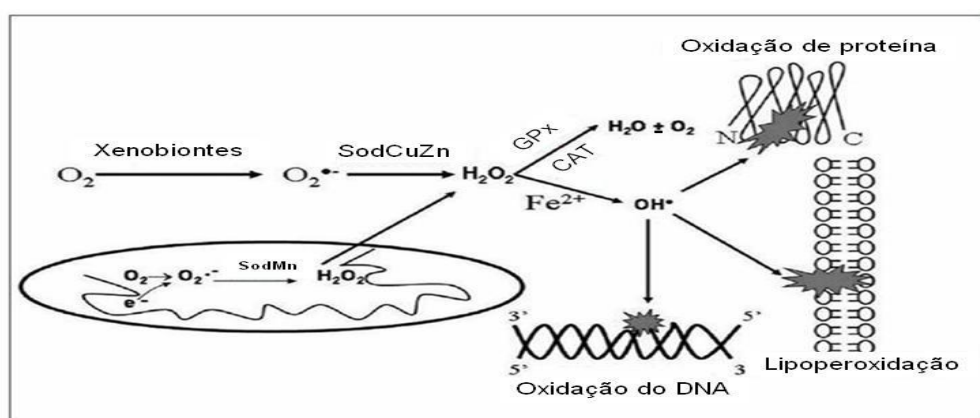


Figura 6. Representação esquemática de dano celular causado por espécies reativas de oxigênio. (Adaptado de Ramakrishnan, Rajesh e Sulochana, 2007)

A avaliação do estresse oxidativo depende da habilidade de aferição da presença de EROs. Estas podem ser medidas diretamente, por meio de sua concentração em fluidos biológicos e tecidos, ou indiretamente, mediante a avaliação do dano que causam. A detecção direta das EROs em sistemas biológicos é dificultada por suas concentrações extremamente baixas (da ordem de $10^{-11}M$) e altas velocidades de reação (Reyes *et al*, 2006). As técnicas de análise podem ser empregadas mediante, pelo menos, três abordagens: pela medida da concentração de moléculas resultantes

da reação com as EROs, pela quantificação da magnitude do dano produzido por meio das EROs ou, pela quantificação da capacidade antioxidante (Reyes *et al*, 2006).

Diante das limitações para se medir diretamente a concentração de EROs, a aferição indireta, mediante avaliação do dano que causam, vem sendo considerada uma alternativa promissora no monitoramento, *in vivo*, do estresse oxidativo. Os biomarcadores do dano oxidativo são classificados de acordo com a biomolécula sobre a qual as EROs atuam: lípidos, proteína ou DNA (Halliwell e Gutteridge, 1990; Reyes *et al*, 2006, Chung e Marwick, 2010).

Uma das técnicas de maior relevância na quantificação de danos oxidativos em lípidos, consiste em medir, por meio de métodos colorimétricos, as substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (*thiobarbituric acid* – TBARS) (Liu *et al*, 1997). Os aldeídos são substâncias que se destacam como metabólitos secundários da oxidação de lípidos. Dentre estes compostos, o malondialdeído é um dos mais abundantes, resultante da peroxidação lipídica tecidual, principalmente dos AA, EPA, DHA. Neste teste uma molécula de malondialdeído reage com duas de ácido tiobarbitúrico, formando-se um complexo de cor vermelha que é lido em um comprimento de onda específico (532-535 nm) (Mayne, 2003; Halliwell e Gutteridge, 1990). Apesar de sua simplicidade e facilidade de execução, o teste do TBARS não é específico para o malondialdeído, reagindo com uma ampla variedade de compostos, entre eles, outros aldeídos que não o malondialdeído e ainda, açúcares, aminoácidos, proteína, aminas e bilirrubina (Grotto *et al*, 2007).

1.7. Lipoperoxidação

A consequência do estresse oxidativo mais comumente descrita é a lipoperoxidação, a qual envolve reações em cadeia em três etapas: iniciação, propagação e terminação.

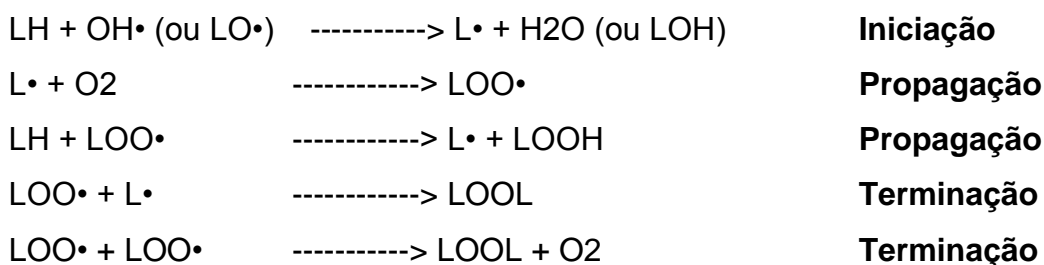


Figura 7. Etapas da lipoperoxidação lipídica

Na etapa de iniciação ocorre o sequestro do hidrogênio do ácido graxo insaturado da membrana celular. Tal sequestro pode ser realizado pelo radical hidroxil ($OH\cdot$) ou pelo radical alcóxil ($LO\cdot$) com consequente formação do radical lipídico $L\cdot$. Na propagação o $L\cdot$ reage com o O_2 resultando no radical peróxila ($LOO\cdot$), que por sua vez sequestra novo hidrogênio do ácido graxo insaturado, tornando-o novamente $L\cdot$, formando hidroperóxido lipídico ($LOOH$) e continuando a etapa da propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando $L\cdot$ ou $LOO\cdot$ se propaga até se neutralizar (Ferreira e Matsubara, 1997; Bajka *et al*, 2008).

O começo da reação geralmente ocorre através da abstração de átomo de hidrogênio de um grupo metileno ($-CH_2$) através do ataque de uma molécula reativa, como EROs, metais, ou outros radicais livres, formando um radical de carbono. Este, por sua vez, realizará um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado, o qual pode reagir com moléculas de oxigênio formando um radical peróxila ($ROO\cdot$). A partir da formação deste radical ocorre a fase de propagação, devido a sua capacidade de abstrair átomos de hidrogênio de outros grupos metileno de cadeias adjacentes

transformando-se em um peróxido lipídico (ROOH). Estes sofrerão processos de rearranjo molecular, formação de dienos conjugados e, posteriormente, ataque de moléculas de oxigênio, formando um novo ROO[•]. Este reinicia o processo, gerando uma reação oxidativa em cadeia. (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Vários fatores contribuem para o término deste processo cíclico de lipoperoxidação, tais como a neutralização desses inúmeros radicais por antioxidantes, formação de produtos não radicalares, consumo de reagentes, dentre outros.

Os fenômenos de oxidação dos lipídios dependem de mecanismos reacionais diversos e extremamente complexos, os quais estão relacionados com o tipo de estrutura lipídica e o meio onde esta se encontra. O número e a natureza das insaturações presentes, o tipo de interface entre os lipídios e o oxigênio (fase lipídica contínua, dispersa ou em emulsão), a exposição à luz e ao calor, a presença de pró-oxidantes (por exemplo ions metálicos de transição) ou de antioxidantes, são alguns fatores determinantes para a estabilidade oxidativa dos lipídios.

Os AGPIs encontrados nas membranas biológicas são particularmente vulneráveis ao processo de lipoperoxidação devido às suas múltiplas duplas ligações ao longo de suas cadeias. O dano oxidativo de membranas resulta na formação de ligações cruzadas entre proteínas e fosfolipídeos, destruindo o arranjo espacial da membrana e inativando-a irreversivelmente. As alterações decorrentes deste processo incluem destruição da estrutura e alteração da permeabilidade das membranas celulares. Conseqüentemente, há perda da seletividade para entrada e saída de nutrientes e substâncias tóxicas, liberação do conteúdo das organelas, formação de produtos citotóxicos e alteração do DNA, culminando com a morte celular (Meneghini *et al*, 1988). O dano oxidativo resulta no aumento da fluidez, o que irá afetar a homeostase da célula e comprometer a integridade da mesma (Sies, 2007).

Em alguns casos, o aumento da lipoperoxidação está associada ao desenvolvimento e progressão de doenças crônicas e suas complicações, as quais são usualmente acompanhadas pelo aumento da produção de radicais livres ou falha na defesa antioxidante (Halliwell e Gutteridge, 1990).

1.8. Sistema de defesa antioxidante

Halliwell e Gutteridge (1990) definem como antioxidante qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas a de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato.

Os antioxidantes inibem os danos oxidativos diretamente pelo sequestro ou pela ativação de espécies sequestradoras de oxigênio. De maneira geral, podem ser classificados como antioxidantes enzimáticos e antioxidantes não enzimáticos (Bianchi, 1999) como mostra a Tabela 5.

Tabela 5. Resumo das principais agentes de defesas antioxidantes no sistema biológico

SISTEMAS	
Não Enzimáticos	Enzimáticos
α -Tocoferol	Superóxido dismutase
β Caroteno	Catalase
Ácido Ascórbico	NADPH quinona oxidoreductase
Proteínas do plasma	Glutathione peroxidase
Selênio	Enzimas de reparo
Glutathione	
Clorofilina	
Flavonóides	
L – Cisteína	
Ácido úrico	

Os antioxidantes enzimáticos, também conhecidos como antioxidantes endógenos, são enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GSH) (Yun-Zhong *et al*, 2002), as quais apresentam a capacidade de remover espécies reativas de oxigênio, ou seja, bloqueiam a iniciação da oxidação. Os antioxidantes não enzimáticos são moléculas

que reagem com os radicais e são consumidas durante a reação de oxidação. (Lasheras *et al*, 2003; Uttara *et al*, 2009).

Estudos epidemiológicos demonstraram que compostos antioxidantes possuem atividade antiinflamatória, antiaterosclerótica, antitumoral, antimutagênica, anticarcinogênica, antibacteriana e antiviral e neuroproteção (Hirvonen *et al*, 2000; Owen *et al*, 2000; Sala *et al*, 2002; Shen *et al*, 2009).

As ações dos antioxidantes endógenos, bem como o consumo de antioxidantes naturais, previnem a geração de radicais livres, a oxidação de proteínas e a peroxidação lipídica, formando uma barreira natural contra os possíveis danos causados pelo estresse oxidativo no organismo (Rodacki, 2012). Estudos têm mostrado que a oxidação de biomoléculas pode ser inibida pelo consumo de quantidades apropriadas de compostos antioxidantes a partir de uma dieta diária equilibrada (Bose e Agarwal, 2007; Thomson *et al*, 2007; Takeda *et al*, 2008).

Para prevenir ou reduzir os efeitos do estresse oxidativo, o organismo está equipado com diversos mecanismos de defesa antioxidante, tais como a presença de antioxidantes não enzimáticos (β - caroteno, selênio, α -tocoferol, vitamina C, compostos fenólicos etc.) e os antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT e GPX) que neutralizam ou reduzem a ação das EROs (Yu 1994).

O sistema antioxidante enzimático constitui a primeira defesa endógena a agir aos ataques das EROs, impedindo sua formação ou sequestram-nas de forma a impedir sua interação com alvos celulares, ou seja, bloqueiam a etapa de iniciação da cadeia radicalar (Rover Júnior *et al* 2001).

As enzimas antioxidantes endógenas, juntamente com outras moléculas trabalham para manter a homeostase redox, sendo as mais importantes, a catalase, a glutathiona peroxidase e o superóxido dismutase. A catalase bem como a superóxido dismutase removem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), enquanto a glutathiona reduz além do H_2O_2 , peróxidos orgânicos, como os peróxidos de lipídeos. Estas enzimas são reguladas pelo potencial genético e vários fatores celulares. (Jacob, 1995).

A SOD é a enzima que tem papel fundamental na defesa do organismo contra o ataque de EROs pois atua através da dismutação do radical H_2O_2 e oxigênio

(Winterbour e Kettle 2003). Existem três isoformas dessa enzima: a cobre/zinco dependente (Cu/Zn dependente), a manganês dependente (Mn SOD) e a ferro dependente (Fe SOD). Sua atividade varia conforme o tecido sendo que os níveis mais elevados se encontram no fígado, glândula adrenal, rins e baço. A SOD apresenta uma isoforma mitocondrial (Mn SOD) e uma isoforma citosólica (Cu/Zn SOD), havendo também isoforma extracelular (Halliwell e Gutteridge, 1990).

A família de GPx reduz H_2O_2 e outros peróxidos a água ou álcool. Apresenta-se sob 4 formas: GPx 1 ou clássica, encontrada no citosol de todas as células do corpo; GPx 2 ou gastrointestinal, específica do trato gastrointestinal; GPx 3 ou plasmática ou extracelular, encontrada no fluido do revestimento interno do pulmão e no leite materno, além do plasma em mamíferos, e a GPx 4, que atua sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos nas membranas e lipoproteínas, reduzindo, também, o hidroperóxido da timina, formado como consequência do ataque dos radicais à base timina do DNA. (Vasconcelos *et al*, 2007). As GPx, em geral, catalisam a redução do H_2O_2 , às custas da conversão da GSH e glutathiona oxidada (GSSG), água, peróxidos orgânicos a álcool (Ferreira e Matsubara, 1997).

A CAT é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução de H_2O_2 a água e oxigênio. A CAT está localizada principalmente nos peroxissomos da maioria das células aeróbicas e, em animais, se encontram principalmente no fígado, rins e eritrócitos. Órgãos como cérebro, coração e músculo esquelético contém pequenas quantidades da enzima (Halliwell e Gutteridge, 1990)

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação de óleo de peixe (via enteral), da emulsão de óleo de peixe (via parenteral) e de um concentrado de óleo de peixe (via enteral), obtido por processo biotecnológico, no perfil de ácidos graxos de lípidos hepáticos e no sistema oxidante-antioxidante de ratos.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar em ratos Wistar suplementados com óleo de peixe (via enteral) e emulsão de óleo de peixe (via parenteral), durante três dias consecutivos na dose de 0.2g/kg/dia, os seguintes parâmetros:

- ✓ Composição em ácidos graxos por cromatografia à gás dos lípidos neutros e polares presentes no fígado;
- ✓ Oxidação lipídica do fígado através da determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- ✓ Atividade hepática das enzimas SOD e CAT;
- ✓ Expressão hepática da enzima $\Delta 6$ -dessaturase (FADS2), envolvida na etapa de dessaturação dos ácidos graxos, por *western blot*.

Comparar os parâmetros descritos acima com os dados obtidos para outro grupo de animais suplementados com óleo de soja (via enteral) e emulsão de óleo de soja (via parenteral), suplementados nas mesmas condições do óleo de peixe (e emulsão de óleo de peixe),

Avaliar o sistema oxidante-antioxidante (TBARS, CAT e SOD) e a composição em ácidos graxos dos lípidos totais dos animais controle e àqueles suplementados com o concentrado de óleo de peixe obtido por processo biotecnológico a partir da hidrólise enzimática do óleo de sardinha.

3. METODOLOGIA

3.1. Preparo do concentrado de óleo de peixe

O concentrado de óleo de peixe foi obtido segundo descrito por Carvalho et al (2003) a partir da reação de hidrólise do óleo de sardinha catalisada por lipase de *Candida cylindracea*. O óleo de sardinha obtido da Alcyon Co (São Paulo) contendo 25,5% de AGPI n-3 (15,3% de EPA e 10,2% de DHA) foi hidrolisado com a lipase (150U) por 8 horas de reação e os acilgliceróis resultantes da hidrólise foram separados dos ácidos graxos residuais do sistema de reação. Em seguida, a mistura das frações de acilgliceróis dos sistemas de reação foram misturados e levados para secagem do solvente em rotaevaporador à vácuo e secagem final em atmosfera de N₂. O óleo residual foi armazenado em freezer a -4°C e posteriormente utilizado na suplementação dos animais. Para a avaliação da composição de ácidos graxos o concentrado de óleo de peixe foi levado para a reação de transesterificação onde os ácidos graxos foram convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos usando BF₃ metanol como reagente esterificante, de acordo com o método sugerido pelo American Oil Chemist's Society (AOCS, 1993). Os ésteres metílicos diluídos em hexano foram analisados por cromatografia à gás usando cromatógrafo CHROMPACK® conforme descrito no item 3.6. A reação de hidrólise foi capaz de aumentar os níveis de EPA e DHA no óleo de peixe para 19,4 e 21,5% respectivamente, totalizando aproximadamente 40% de AGPI n-3.

3.2. Animais e tratamento

Os procedimentos experimentais envolvendo animais seguiram as regras estabelecidas pelo guia de Princípios Éticos de uso de animais de laboratório e foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (Parecer n° 1579/11) e pelo Comitê de ética no uso de animal em Pesquisa (CEUA) da USF (Parecer n° 001.10.12).

O tratamento dos animais foi realizado na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Departamento: Ciências Biológicas, Campus São Paulo, sob orientação da Profa. Dra. Vera Lucia Flor Silveira e Dra Karina Vieira de Barros Munhoz.

Foram utilizados ratos *Wistar*, machos, albinos, heterozigotos, procedentes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da UNIFESP, com idade variável entre 120 a 150 dias e pesando entre 400 e 500g. Os animais passaram por um período de adaptação às condições ambientais durante uma semana e foram mantidos em um período claro/escuro de 12 horas, temperatura $22^{\circ}\text{C} \pm 3$ e de umidade 55 ± 3 , com livre acesso a água e ração Labina® (Purina®), cuja composição é de, aproximadamente, 23% de proteína bruta, 4% de lípidos totais, 5% de fibras e 12% de minerais.

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais, com três animais para cada grupo, e a suplementação com óleo (via enteral) e emulsão lipídica (via parenteral), na dose de 0.2g/kg de peso corpóreo, ocorreu por 3 dias consecutivos. Foi utilizado um grupo controle com solução salina (0.2g/kg de peso corpóreo) para cada via de administração. No quarto dia, após 24 horas da última suplementação, os animais foram anestesiados e sacrificados por decapitação. Os grupos experimentais e controle foram divididos de acordo com o tipo de suplementação e a via de administração utilizada:

Grupo 1. Animais que receberam solução salina por gavagem (via enteral)

Grupo 2. Animais que receberam óleo de soja por gavagem (via enteral)

Grupo 3. Animais que receberam óleo de peixe por gavagem (via enteral)

Grupo 4. Animais que receberam solução salina por via parenteral

Grupo 5. Animais que receberam emulsão lipídica a base de óleo de soja (Lipovenos) por via parenteral

Grupo 6. Animais que receberam emulsão lipídica a base de óleo de peixe (Omegaven) por via parenteral

Para a suplementação por gavagem foram utilizados óleo de peixe em cápsula (Naturalis), e óleo de soja (Liza), administrados com auxílio de seringa e agulha específica de gavagem para ratos (agulha de aço inox; cânula diâmetro 1,2mm com

esfera de 2,3mm e comprimento de 45mm). Para a suplementação endovenosa foram utilizadas emulsões lipídicas a base de óleo de peixe (Omegaven, Fresenius Kabi, Alemanha) e a base de óleo de soja (Lipovenos, Fresenius Kabi, Alemanha). A emulsão foi administrada em um acesso venoso central, durante 3 horas, com auxílio de uma bomba de infusão. O acesso foi mantido durante o período de suplementação. As informações nutricionais dos suplementos estão descritas nas Tabelas 6, 7, 8 e 9, conforme especificação nas bulas dos fabricantes.

Adicionalmente, foram utilizados mais dois grupos, sendo um controle e o outro que recebeu o concentrado de óleo de peixe administrado na dose de 0.2g/kg de peso corpóreo por 3 dias consecutivos, nas mesmas condições dos demais grupos:

Grupo 7. Animais que receberam solução salina por gavagem

Grupo 8. Animais que receberam o concentrado de óleo de peixe por gavagem

A divisão dos grupos experimentais está ilustrada na Figura 10.

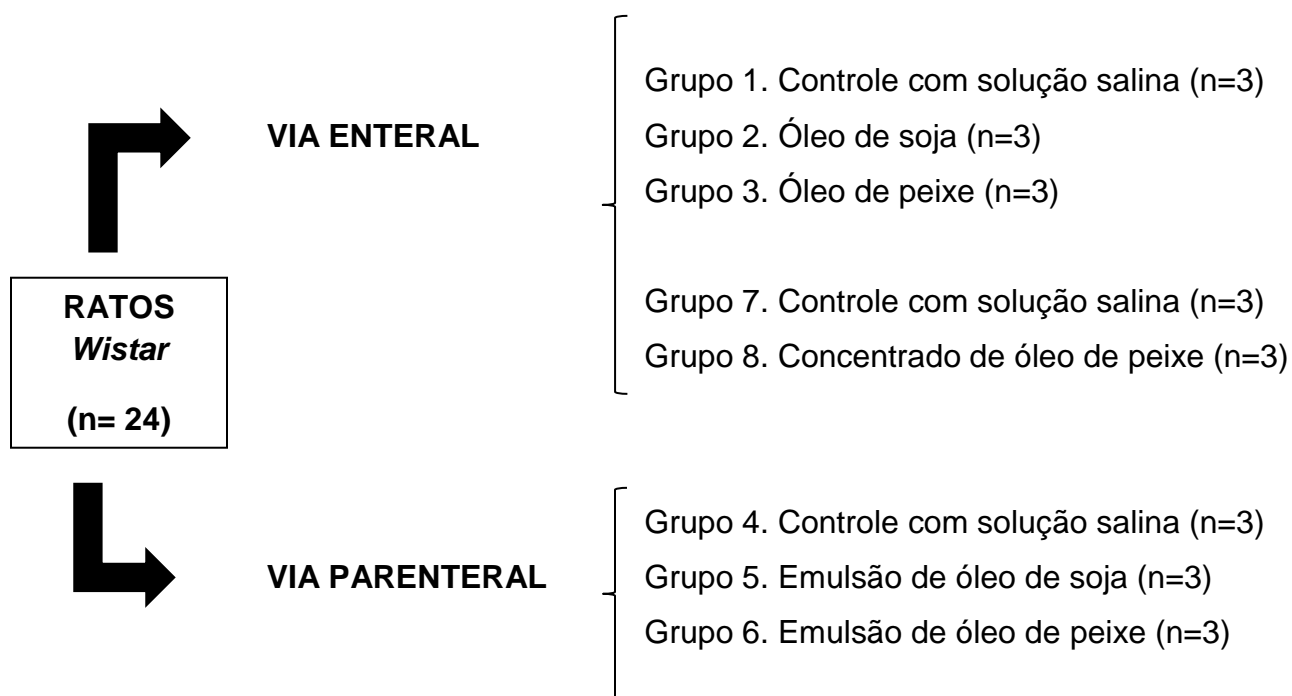


Figura 8. Divisão dos animais nos grupos experimentais por via de administração

Tabela 6. Informação Nutricional do óleo de soja (marca Liza) em porção de 13ml (1 colher de sopa)

Valor energético	108kcal = 454KJ
Carboidratos	0g
Proteínas	0g
Gorduras totais	12,0g
Gorduras saturadas	2,0g
Gorduras trans	não contém
Gorduras monoinsaturadas	2,9g
Gorduras poliinsaturados	7,1g
Colesterol	0mg
Fibra alimentar	0g
Sódio	0mg
Vitamina E	1,7mg

Tabela 7. Informação Nutricional da cápsula de óleo de peixe (marca Naturalis) em porção de 3,0g (3 cápsulas)

Valor energético	27kcal = 113KJ
Carboidratos	0g
Proteínas	0g
Gorduras totais	3,0g
Gorduras saturadas	0,9g
Gorduras trans	0g
Fibra alimentar	0g
Sódio	0mg
Vitamina E	3,0mg
Ácido docosahexaenóico (DHA)	120mg
Ácido eicosapentaenóico (EPA)	180mg

Tabela 8. Informação Nutricional do Lipovenos (marca Fresenius Kabi) em porção de 100 ml cada (por via parenteral).

Valor energético	4600 kJ/L (1100 kcal/L)
pH	7 – 8,5
Osmolaridade (mOsm/l)	273
Óleo de soja purificado	100 g
Glicerol	25 g
Lecitina de ovo (g/L)	12 g

Tabela 9. Informação Nutricional do Omegaven (marca Fresenius Kabi) em porção de 100 ml cada (por via parenteral).

Energia total	470 kJ/100 mL = 112 kcal/100 mL
pH	7,5 a 8,7
Acidez de titulação	< 1 mmol HCl/L
Osmolaridade teórica	273 mOsm/L
Ácido eicosapentaenóico (EPA)	1,25 - 2,82 g
Ácido docosahexaenóico (DHA)	1,44 - 3,09 g
Ácido mirístico	0,1 - 0,6 g
Ácido palmítico	0,25 - 1,0 g
Ácido palmitoléico	0,3 - 0,9 g
Ácido esteárico	0,05 - 0,2 g
Ácido oléico	0,6 - 1,3 g
Ácido linoléico	0,1 - 0,7 g
Ácido linolênico	≤ 0,2 g
Ácido octadecatetraenóico	0,05 - 0,65 g
Ácido eicosaenóico	0,05 - 0,3 g
Ácido araquidônico	0,1 - 0,4 g
Ácido docosaenóico	≤ 0,15 g
Ácido docosapentaenóico	0,15 - 0,45 g
Racealfatocoferol	0,015 - 0,0296 g

3.3. Coleta de amostras

No quarto dia após o início do tratamento dietético, 24 horas após a última administração, os animais foram anestesiados com Ketamina/Xilazina (66,6/13,3 mg/Kg i.p.) e foi feita uma incisão abdominal mediana para a remoção do fígado, o qual foi acondicionado em frasco seco e congelado imediatamente em freezer a – 80°C.

3.4. Extração dos lípides totais

Amostras de fígado (100mg) foram previamente homogeneizadas em homogeneizador Turrax utilizando 5mL de solução salina 0,9% mantida em geladeira. Em seguida, a extração total dos lípides foi realizada através do tratamento das amostras com clorofórmio: metanol (2:1, v/v) em temperatura ambiente de acordo com o procedimento descrito por Folch *et al* (1957). A cada 0,8 mL de amostra foi adicionado 5 mL da mistura clorofórmio:metanol contendo 50 mg/L de BHT (antioxidante), levados a agitação por 20 minutos, e posteriormente adicionado mais 1,0 mL de NaCl 1M e levado ao vórtex por mais 2 minutos. Após centrifugação (2000 rpm por 10 min) a camada inferior foi coletada em tudo seco.

3.5. Separação dos lípides por extração em fase sólida

Os lípides totais extraídos do fígado foram dissolvidos em 2mL de clorofórmio e a separação das classes de lípides foi realizada pelo processo de extração em fase sólida utilizando cartuchos de aminopropilsilica (BondElut® NH₂, Agilent) segundo descrito por Burdge *et al* (2002). Foi realizada a separação dos lípides neutros (ésteres de colesterol e triacilglicerol) utilizando 2 mL de clorofórmio, passando por duas vezes o clorofórmio no cartucho. Em seguida, foram obtidos os lípides polares após lavagem com 2 mL da mistura clorofórmio e metanol (60:40 v/v) para extração da fração de fosfatidilcolina e 2 mL de metanol puro para a extração da fração de fosfatidiletanolamina. As duas frações foram coletadas juntas e intituladas como lípides polares.

3.6. Determinação do perfil de ácidos graxos por cromatografia à gás

Os lípides totais e as frações de lípidos (neutros e polares) foram levados para a reação transesterificação onde os ácidos graxos foram convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos usando BF_3 metanol como reagente esterificante (AOCS, 1993). Os ésteres metílicos diluídos em hexano foram analisados por cromatografia à gás usando cromatógrafo CHROMPACK® chromatographer (modelo CP 9001) com o detector de ionização em chama e a coluna capilar CP-Sil 88 (Chrompack, WCOT Fused Silica). As temperaturas do detector foram de 280°C e a do injetor foi de 250°C . A temperatura inicial da coluna foi de 180°C por 2 minutos, programado para aumentar 10°C por minuto até 210°C no tempo total de corrida de 30 minutos. O gás de arraste usado foi o hidrogênio na frequência de fluxo de 2,0 mL/ minuto. A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação do tempo de retenção dos componentes das amostras com padrões autênticos de ésteres metílicos de ácidos graxos (Supelco) injetados sob as mesmas condições de análise. A composição dos ácidos graxos foi expressa em relação ao percentual dos ácidos graxos totais, calculada segundo o valor de área de cada pico usando o software N2000.

3.7. Medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), usada para avaliar a lipoperoxidação, consiste na análise de produtos finais da peroxidação lipídica (malondialdeído e demais aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagir com o ácido tiobarbitúrico formam bases de Schiff. O malondialdeído (MDA) é um produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da β -ruptura de endociclicização de ácidos graxos poliinsaturados. O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) e forma um cromógeno de cor rosa fluorescente, cuja absorção ocorre em λ de 532 nm (Figura 9).

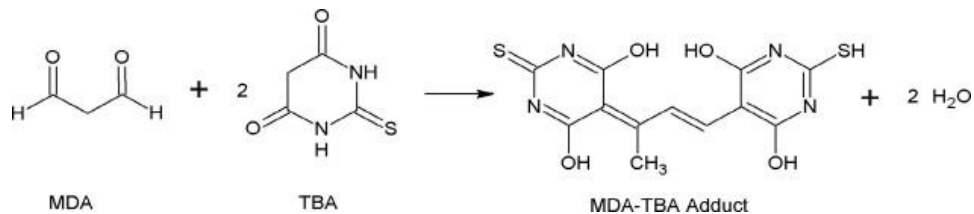


Figura 9. Reação do malondialdeído (MDA) com o tiobarbitúrico (TBA) para formação de um cromógeno de cor rosa.

O procedimento usado baseia-se no descrito por Ohkawa *et al* (1979) com algumas modificações. O homogenato hepático (250µL) foi misturado com 25µL BHT 4% em metanol, 1mL de ácido tricloroacético a 12%, 1mL de ácido tiobarbitúrico 0,73% e 750µL 0,1 mol/L tampão Tris-HCl contendo 0,1mmol/L EDTA pH 7,4. Após 60 minutos de incubação em banho-maria fervente, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e foi adicionado 1,5mL de n-butanol. A amostra foi homogeneizada por 30 segundos em vórtex e centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 532nm. A quantificação foi realizada utilizando uma curva de calibração com tetraetoxipropano (TEP), conforme Figura 10

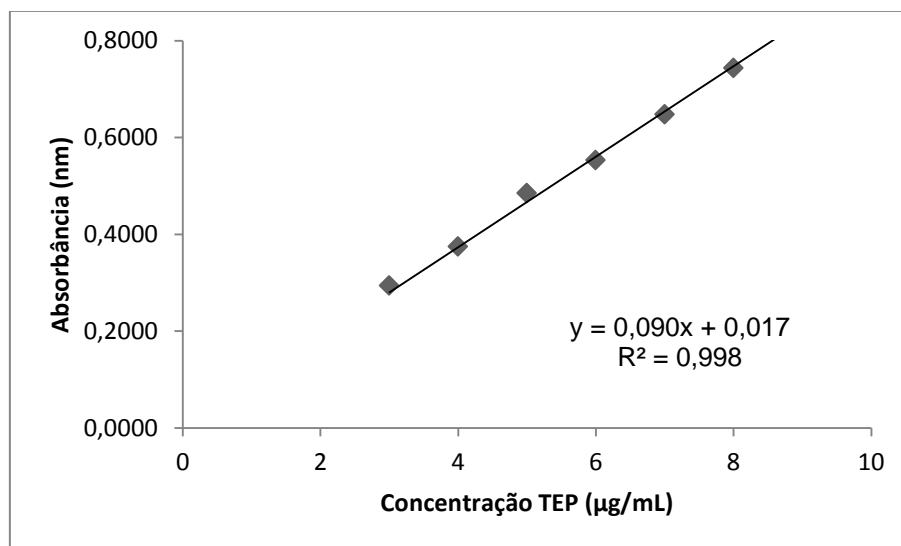


Figura 10. Curva padrão do tetraetoxipropano (TEP)

3.8. Determinação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

O experimento foi realizado no homogenato de fígado utilizando o kit SD-125 da Randox Laboratoris Ltda®, segundo o protocolo padrão do fabricante sob a identificação Ransod Superoxide Dismutase SD125, Ransod Control SD 126 e Ransod Diluent SD 124. O princípio do kit baseou-se no papel da SOD em acelerar a dismutação do radical tóxico superóxido, produzido durante o processo oxidativo em H_2O_2 e O_2 . O método empregou xantina e xantina oxidase para gerar radicais superóxido, os quais reagiram com 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloro de feniltetrazol (INT) para formar o composto vermelho formazan. Resumidamente, foram adicionados 2,5 mL de tampão fosfato a 500 μ L do homogenato, agitado no vórtex, retirado uma alíquota de 50 μ L e transferido para outro tubo. Foi adicionado então, 0,6 mL do substrato (proveniente do kit), agitado novamente no vórtex e acrescentou-se a esta mistura 1 mL de H_2O destilada, 250 μ L de xantina oxidase, e novamente agitado em vórtex. A absorbância foi lida em espectrofotômetro Jenway 6105 UV/VIS em 505 nm, após 30 segundos da adição da xantina. O resultado foi expresso como U/mg de proteína total presente no homogenato hepático. A quantificação de proteína foi determinada pelo método de Biureto, utilizando o Kit comercial da Bioclin ®, e a albumina de soro bovino como padrão. O resultado foi expresso como U/mL de proteína total presente no homogenato hepático.

3.9. Determinação da atividade da Catalase (CAT) e Proteínas Totais

O experimento foi realizado no homogenato de fígado segundo o protocolo padrão do kit CAT 100 (Catalog Number CAT 100) da empresa Sigma Aldrich®, baseado no método descrito por Beutler (1975). A atividade da enzima catalase foi determinada pela velocidade de consumo de H_2O_2 , a qual expressa a velocidade de decomposição de H_2O_2 em água e oxigênio catalisada por esta enzima. As amostras de homogenato (diluição 1:40) no volume final de 1 mL, foram colocadas em cubetas de quartzo. A seguir, foi adicionada a solução de reação, composta de H_2O_2 10mM (10 μ L

de peridol 30% em 10 mL de água destilada) e tampão Tris-HCl 1M EDTA 5mM em pH 8,0. As cubetas permaneceram na temperatura de 37°C por 15 minutos. Em seguida foi realizada a leitura da absorbância a 520 nm. O resultado foi expresso como U/mL de catalase presente no homogenato hepático.

A quantificação de proteína foi determinada pelo método de Biureto, utilizando o Kit de proteína total da Bioclin®, e a albumina de soro bovino como padrão. A leitura foi realizada em 545 nm.

3.10. Análise da expressão da $\Delta 6$ - dessaturase (FADS2)

A quantificação da enzima hepática FADS2 (fatty acid desaturase 2) foi realizada pela técnica de *Western blot* segundo descrito por Laemmli (1970). Primeiramente foi preparado um homogenato com 1 g de fígado em 5 mL de tampão de lise (NaCl 140mM, EDTA 15 mM, glicerol 10%, Tris 20mM; pH 8,0), ao qual adicionou-se uma mistura de inibidores de proteases (PMSF, aprotinina e inibidor de tripsina) e em seguida as amostras foram incubadas durante 30 minutos à 4°C, retirando-se o sobrenadante em alíquotas. Posteriormente foi selecionada uma quantidade de amostra equivalente à 50µg de proteínas, feita a diluição em solução Tris/HCl 0,5M, DTT 1% e azul de bromofenol e incubadas durante 5 minutos a 100°C. Após realizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE-) a 9-12% em tampão de eletroforese (Tris 25 mM, glicina 0,2M, SDS 3,5mM; pH 8,8) em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories).

Após a separação por eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (fluoreto de polivinilideno) a fim de permitir sua exposição aos anticorpos. Após a transferência, as membranas foram submetidas a bloqueio de seus sítios inespecíficos com solução de bloqueio contendo 4% de leite em pó desnatado em tampão TTBS (PBS-Tween 20) a 37°C. A membrana foi incubada durante uma noite com anticorpo primário específico (rabbit anti FADS2 1:250, Interprise Santa Cruz) e anti- β -actina. Após este período, ela foi lavada cinco vezes com PBS-Tween. Posteriormente foi incubada durante uma hora com o anticorpo secundário anti-

imunoglobulina de coelho conjugado à HRP (goat anti rabbit - HRP conjugated, 1:2000; Interprise Santa Cruz). Transcorrido este tempo a membrana foi lavada cinco vezes em PBS-Tween. A detecção das proteínas foi feita com o uso do kit colorimétrico Opti-4CN (BioRad) e as bandas quantificadas com o auxílio do programa Scion Image 4.0 para Windows. As intensidades foram normalizadas pelas bandas da β -actina (43KDa) de cada amostra correspondente.

3.11. Análise estatística

Os valores foram expressos como média acompanhados do respectivo desvio padrão da média. Diferenças estatisticamente significante foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Dunnett para comparações múltiplas e fixado o nível mínimo de significância em 5% ($p < 0,05$). As comparações foram realizadas em relação ao tipo de tratamento (salina, peixe e soja) e em relação a via de administração (enteral e parenteral). A análise estatística foi realizada utilizando o programa InStat (versão 2.0) e para a análise e elaboração dos gráficos foi utilizado o programa Origin versão 8.6.

4. RESULTADOS

4.1. Composição de ácidos graxos dos óleos e emulsões usados na suplementação dos animais

As figuras 11 a 15 mostram os cromatogramas da composição de ácidos graxos do óleo de soja, óleo de peixe, concentrado de óleo de peixe e nas emulsões de soja e peixe utilizadas na suplementação dos animais. Os ácidos graxos estão apresentados segundo a sua classificação de acordo com o número de insaturações e posição da primeira insaturação, de acordo com as regras da IUPAC.

O óleo de soja possui na sua composição 55,4% de ácido linoléico (18:2 n-6), 26,0% de ácido oléico (18:1 n-9), 8,7% palmítico (16:0) e pequenas quantidades dos ácidos linolênico (18:3 n-3) e esteárico (18:0) (Figura 11). A composição do óleo de peixe mostra a presença de uma grande variedade de ácidos graxos com predominância dos AGPIs, como o EPA (20:5 n-3) e o DHA (22:6 n-3), perfazendo 30% do total de ácidos graxos. Dos ácidos saturados e monoinsaturados destacam-se o palmítico (16:0) e o oléico (18:1 n-9), respectivamente (Figura 12). O concentrado de óleo de peixe, obtido a partir da hidrólise enzimática do óleo de sardinha, apresenta em sua composição aproximadamente 40% da somatória de DHA (21,5%) e EPA (19,4%).

Na emulsão de óleo de soja os principais ácidos graxos são os mesmos do óleo de soja, ácidos linoléico (18:2 n-6) e oléico (18:1 n-9), uma vez que este óleo junto com a lecitina de soja, são componentes da formulação. O conteúdo total de AGPI n-6, representado pelo ácido linoléico é de aproximadamente 53% do total de ácidos graxos (Figura 14). A emulsão de óleo de peixe possui predominância dos ácidos DHA (24,0%), EPA (22,7%), oléico (11,6%), palmítico (9,2%), e palmitoléico (8,7%). O conteúdo total de AGPI n-3 é de aproximadamente 55% do total de ácidos graxos da composição desta emulsão. A composição dos ácidos graxos das amostras foi determinada por comparação com uma mistura de padrões FAME (Supelco) e expressos como porcentagem relativa de cada ácido graxo em relação ao total.

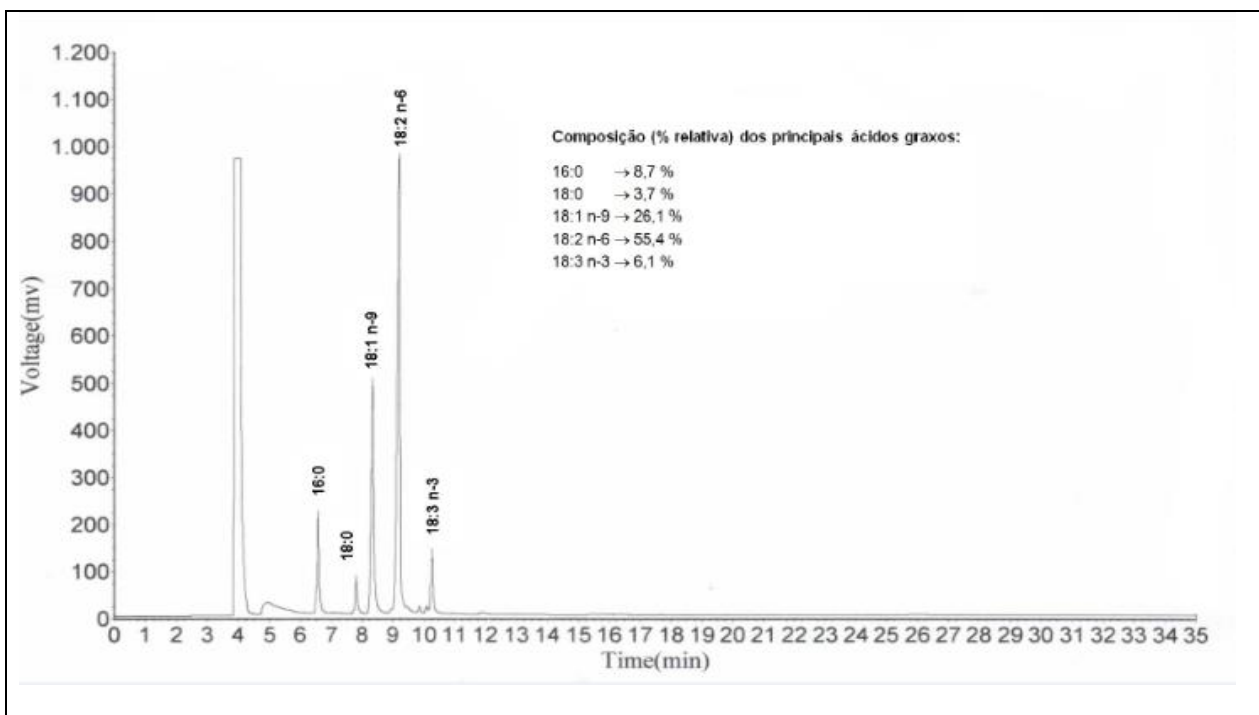


Figura 11. Composição de ácidos graxos do óleo de soja (Liza®)

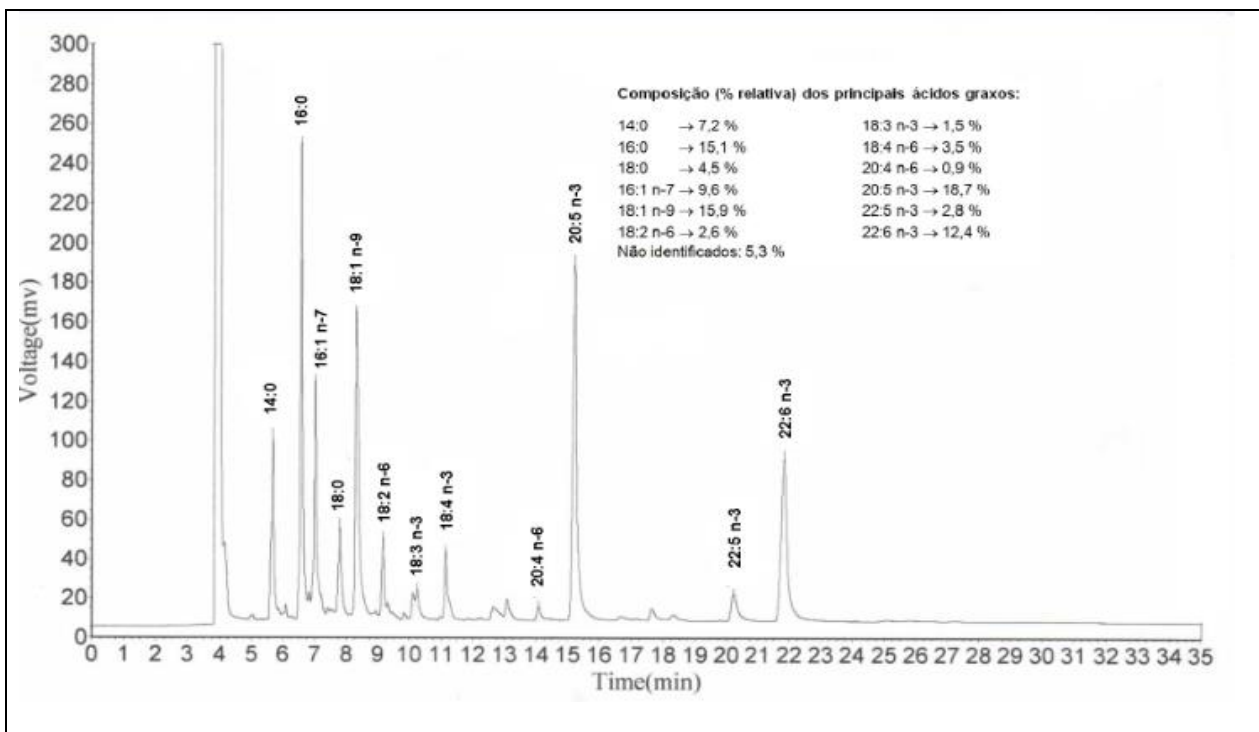


Figura 12. Composição de ácidos graxos do óleo de peixe (Naturalis®)

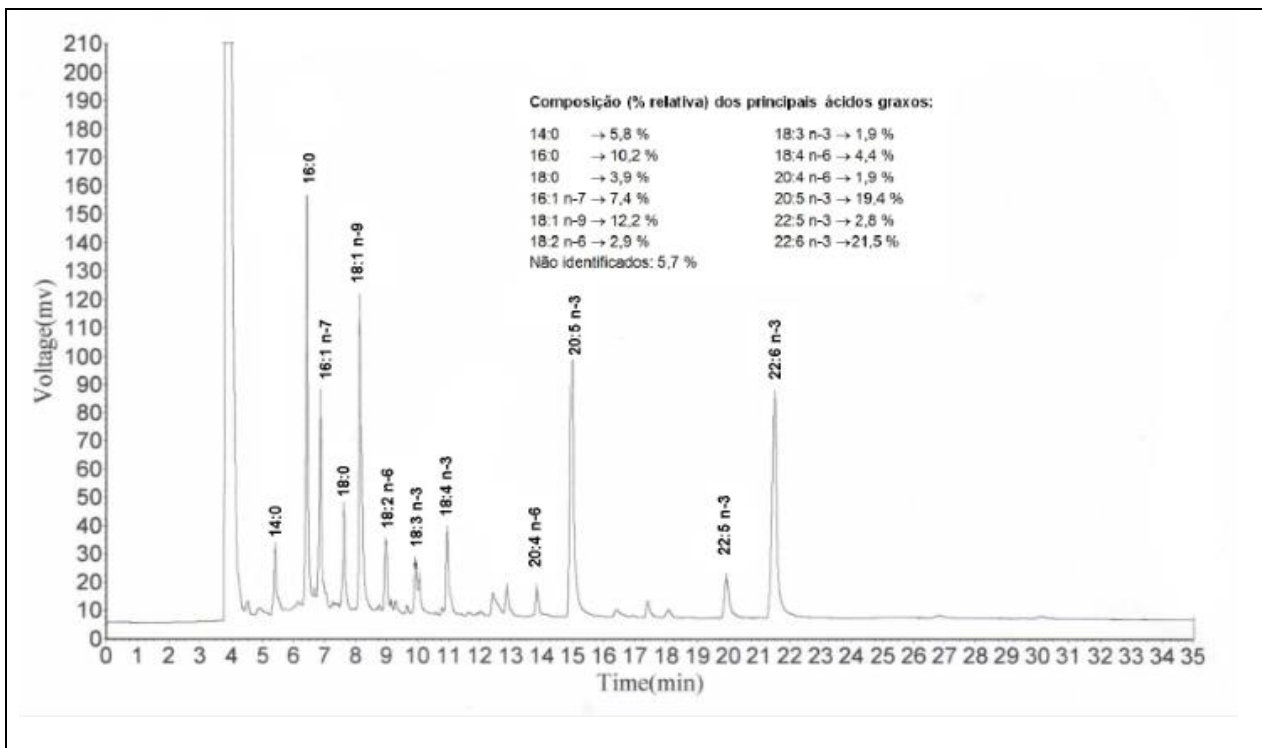


Figura 13. Composição de ácidos graxos do concentrado de óleo de peixe

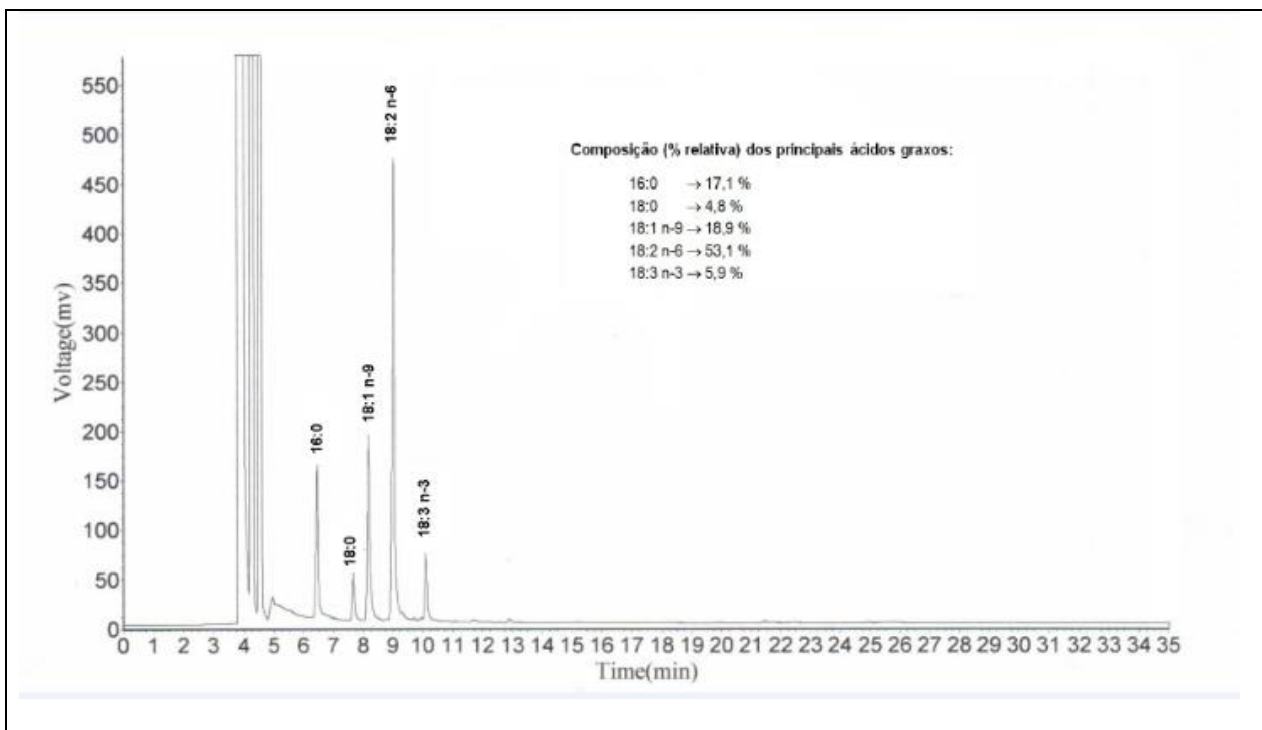


Figura 14. Composição de ácidos graxos da emulsão de óleo de soja (Lipovenus®)

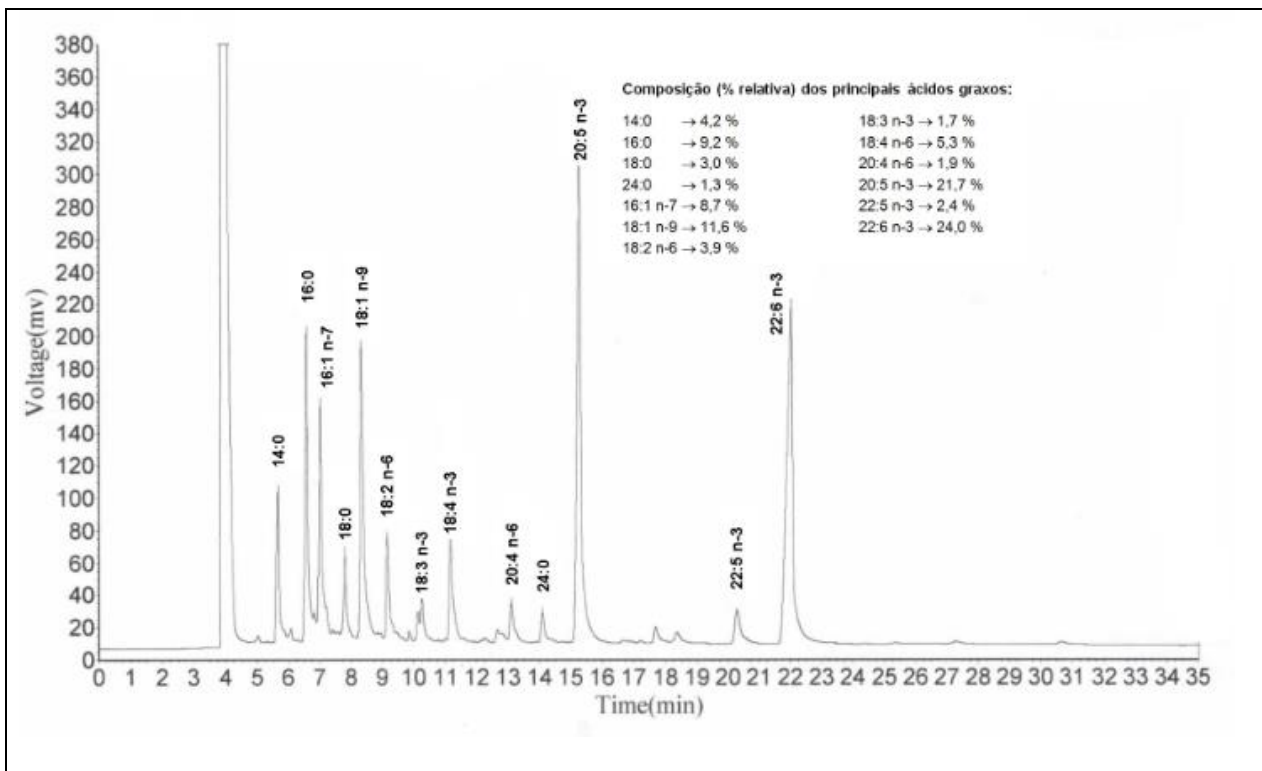


Figura 15. Composição de ácidos graxos da emulsão de óleo de peixe (Omegaven®)

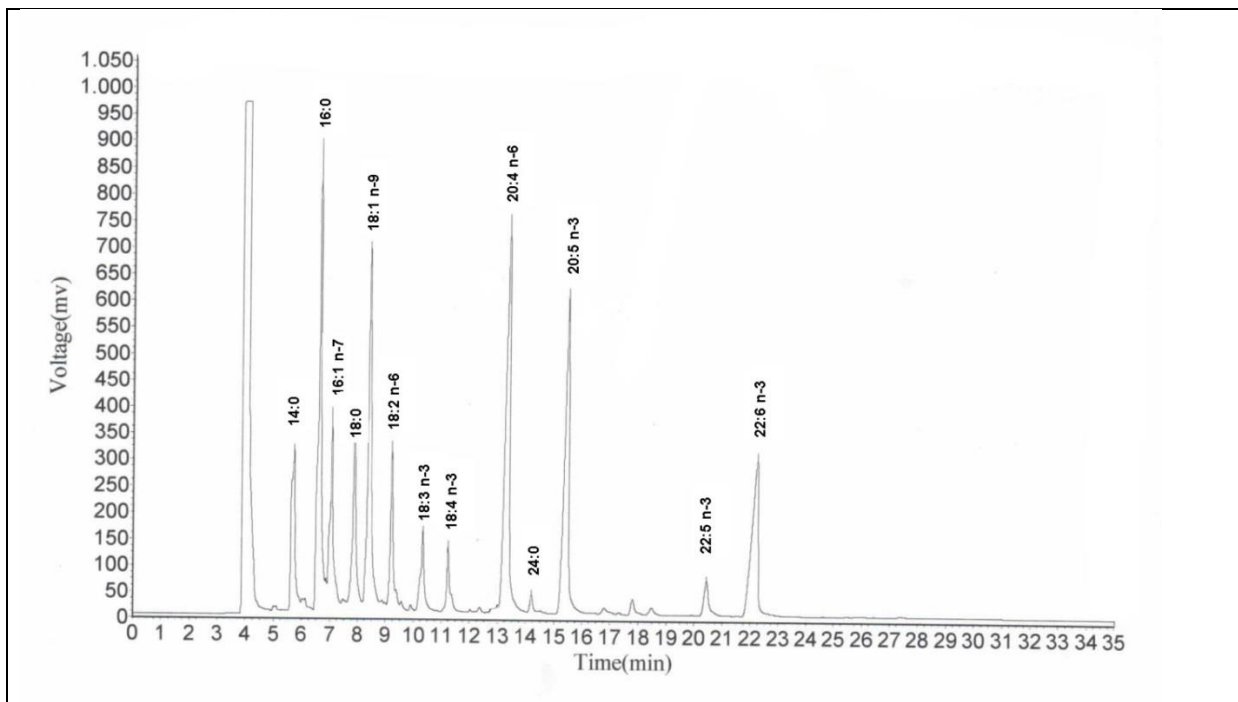


Figura 16. Composição de ácidos graxos da mistura de padrões FAME da Supelco

4.2. Composição de ácidos graxos dos lípides polares e neutros do fígado de animais

A composição dos principais ácidos graxos presentes nas frações de lípidos (neutros e polares) do tecido hepático nos animais controle e suplementados com óleo de soja e peixe pelas vias enteral e parenteral está discriminada nas Tabelas 10 e 11.

Observa-se que na fração de reserva (triacilglicerol) dos lípidos hepáticos dos animais (Tabela 10) há predominância dos ácidos palmítico (16:0), oléico (18:1 n-9) e linoléico (18:2 n-6), os quais são encontrados em níveis superiores aos observados na fração de lípidos polares. Na fração de lípidos polares (Tabela 11) há predominância do ácido esteárico (18:0) e de ácidos insaturados, como AA (20:4), presente em níveis duas vezes (% relativa) superior aos níveis encontrados na fração de lípidos neutros.

A suplementação com o óleo de peixe pela via parenteral promoveu alterações significativas nos níveis de AGPI n-3 nas duas frações de lípidos, em especial nos lípidos polares. Pode-se observar um aumento significativo dos níveis de EPA e DHA comparado ao controle. A somatória dos três AGPI aumentou de $4,51 \pm 0,53\%$ (controle) para $8,69 \pm 0,66\%$ (emulsão de óleo de peixe) na fração de lípidos polares e de $4,28 \pm 0,59\%$ (controle) para $7,29 \pm 0,60\%$ (emulsão de óleo de peixe) na fração de lípidos neutros. O aumento dos níveis de AGPI n-3 nestes animais refletiu na redução significativa da relação AGPI n-6/n-3 observada nos lípidos polares e neutros dos animais que receberam emulsão de óleo de peixe via parenteral.

A suplementação com o óleo de peixe por gavagem levou a um incremento nos níveis de EPA na fração de lípidos neutros, o qual não refletiu na redução da relação dos AGPI n-6/n-3 comparado ao controle.

Foi observado um pequeno acréscimo no teor de AGPIs n-6 dos lípidos neutros de animais que receberam óleo de soja pela via parenteral, embora sem significância (Tabela 10). Por outro lado, nos fosfolípidos dos animais suplementados com óleo de soja pelas duas vias não foi observada nenhuma alteração na composição dos ácidos graxos (Tabela 11).

Tabela 10. Composição de ácidos graxos da fração de lípidos neutros do tecido hepático dos animais controle e suplementados com óleo de soja e de peixe (via enteral) e com emulsão de óleo de soja e de peixe (via parenteral)

Ácidos graxos	Enteral (gavagem)			Parenteral		
	Controle (salina)	Óleo de soja	Óleo de peixe	Controle (salina)	Emulsão de óleo de soja	Emulsão de óleo de peixe
16:0	25,60±1,13	24,55±2,92	21,80±3,70	23,75±3,20	21,60±3,25	21,05±3,04
18:0	8,09±1,57	8,90±2,99	8,85±3,78	8,55±1,92	8,90±3,84	8,95±3,07
∑ AGs saturados	33,6±0,57	33,45±1,91	30,65±2,37	32,31±2,49	30,50±5,37	30,00±3,11
16:1 n-7	3,80±0,14	3,05±1,06	2,95±1,34	3,55±0,35	2,80±0,14	3,30±0,57
18:1 n-9	21,15±1,35	21,05±2,35	23,05±2,91	22,20±2,82	20,40±3,13	22,10±2,84
∑ AGs monoinsaturados	24,95±1,85	24,10±1,67	26,00±1,45	25,75±1,56	23,20±2,96	25,38±2,83
18:2 n-6	26,95±1,78	31,09±2,48	28,10±2,42	29,50±1,55	30,70±3,56	29,00±0,99
20:4 n-6	7,00±0,82	6,08±1,35	6,85±2,10	6,75±3,50	7,60±2,80	6,35±2,77
∑ AGPIs n-6	33,95±1,49	36,94±2,82	34,95±3,34	36,25±2,42	38,29±1,27	35,35±1,91#
18:3 n-3	1,17±0,36	1,04±0,25	1,30±0,33	1,07±0,22	1,22±0,44	1,40±0,76
20:5 n-3	0,18±0,01	0,19±0,05	0,31±0,04*	0,19±0,08	0,18±0,20	0,90±0,07*#‡
22:5 n-3	1,01±0,30	0,85±0,13	1,08±0,21	1,08±0,21	0,97±0,25	1,43±0,27
22:6 n-3	2,41±0,70	1,92±0,25	2,08±0,22	1,93±0,14	1,67±0,17	3,56±0,50*#‡
∑AGPIs n-3	4,77±1,38	4,05±0,54	4,78±0,69	4,28±0,59	4,05±0,54	7,29±0,60*#‡
∑AGPI n-6/∑ AGPI n-3	8,45±3,69	9,27±0,67	7,38±1,42	8,59±1,63	10,06±1,65	4,85±0,94*#‡

*p<0,05 comparado ao respectivo controle; # p<0,05 comparado ao grupo que recebeu emulsão de óleo de soja via parenteral; ‡ p<0,05 comparado ao grupo que recebeu óleo de peixe via enteral. Os dados representam a média ± DP (n=3).

Tabela 11. Composição de ácidos graxos da fração de lípidos polares do tecido hepático dos animais controle e suplementados com óleo de soja e de peixe (via enteral) e com emulsão de óleo de soja e de peixe (via parenteral)

Ácidos graxos	Enteral (gavagem)			Parenteral		
	Controle (salina)	Óleo de soja	Óleo de peixe	Controle (salina)	Emulsão de óleo de soja	Emulsão de óleo de peixe
16:0	19,25±1,49	20,85±0,65	21,75±1,20	19,50±1,70	19,85±0,78	19,25±1,34
18:0	24,85±2,35	24,20±1,99	23,05±0,50	24,90±1,89	23,60±0,99	24,30±0,14
∑ AGs saturados	44,1±1,84	45,05±1,62	44,80±1,98	44,40±1,57	43,45±0,91	41,55±1,20
16:1 n-7	2,20±0,57	2,50±0,57	2,50±0,44	1,95±0,21	2,45±0,21	2,65±0,35
18:1 n-9	10,70±1,27	10,50±1,13	10,96±0,50	10,60±1,13	9,35±0,78	10,20±0,57
∑AGs monoinsaturados	12,90±1,78	13,00±0,85	13,46±0,36	12,55±0,95	11,80±1,08	12,85±1,38
18:2 n-6 (LA)	22,55±1,06	21,45±1,49	21,95±0,92	22,70±0,57	23,60±1,70	22,10±0,28
20:4 n-6 (AA)	13,10±1,42	13,95±1,21	12,45±2,61	12,15±2,48	13,00±0,85	11,60±1,83
∑ AGPIs n-6	35,65±1,64	35,4±1,69	34,40±3,54	34,85±1,91	36,10±1,24	33,70±2,71#
18:3 n-3	1,05±0,35	0,80±0,14	1,10±0,14	0,95±0,07	1,00±0,28	1,05±0,21
20:5 n-3 (EPA)	0,18±0,07	0,25±0,04	0,28±0,11	0,20±0,02	0,19±0,04	0,74±0,15*#‡
22:5 n-3 (DPA)	1,12±0,42	1,48±0,42	1,16±0,36	0,96±0,09	1,15±0,47	1,74±0,17*‡
22:6 n-3 (DHA)	2,48±0,36	2,34±0,27	2,55±0,35	2,40±0,51	2,59±0,55	5,16±0,37*#‡
∑ AGPIs n-3	4,84±1,10	4,95±0,94	5,10±0,56	4,51±0,53	4,93±0,59	8,69±0,66*#‡
∑AGPI n-6/∑ AGPI n-3	7,57±1,86	7,17±0,95	7,15±0,54	7,80±1,32	7,38±0,90	3,87±0,41*#‡

*p<0,05 comparado ao respectivo controle; # p<0,05 comparado ao grupo que recebeu emulsão de óleo de soja via parenteral; ‡p<0,05 comparado ao grupo que recebeu óleo de peixe via enteral. Os dados representam a média ± DP (n=3).

A relação entre os AGPI de cada família (n-6 e n-3) presentes na fração de lípidos polares e neutros do tecido hepático de ratos suplementados com óleo de peixe pelas vias enteral e parenteral comparados ao controle, podem ser observadas nas Figuras 17 e 18. Observa-se a redução significativa da relação dos AGPI n-6/n-3 nos lípidos polares nos animais suplementados com emulsão de óleo de peixe via parenteral, comparado ao grupo controle e também ao grupo que recebeu emulsão de óleo de soja via parenteral (Figura 17). A mesma redução foi observada nos lípidos neutros dos animais que receberam com emulsão de óleo de peixe via parenteral, comparado ao grupo que recebeu emulsão de óleo de soja via parenteral (Figura 18).

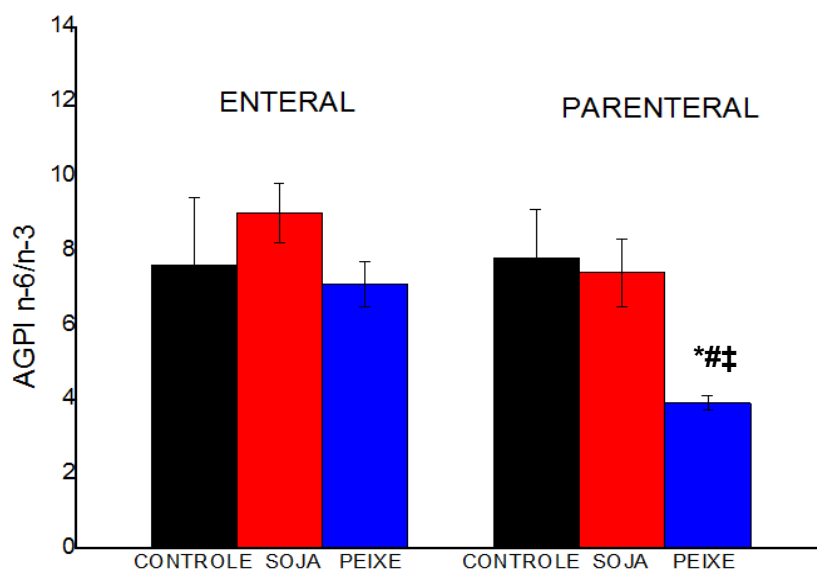


Figura 17. Relação entre o conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados da família n-6 e n-3 da fração de lípides polares do tecido hepático de ratos suplementados com óleo de soja e de peixe pelas vias enteral e parenteral

*p<0,05 comparado ao respectivo controle; # p<0,05 comparado ao grupo que recebeu emulsão de óleo de soja via parenteral; ‡p<0,05 comparado ao grupo que recebeu óleo de peixe via enteral.

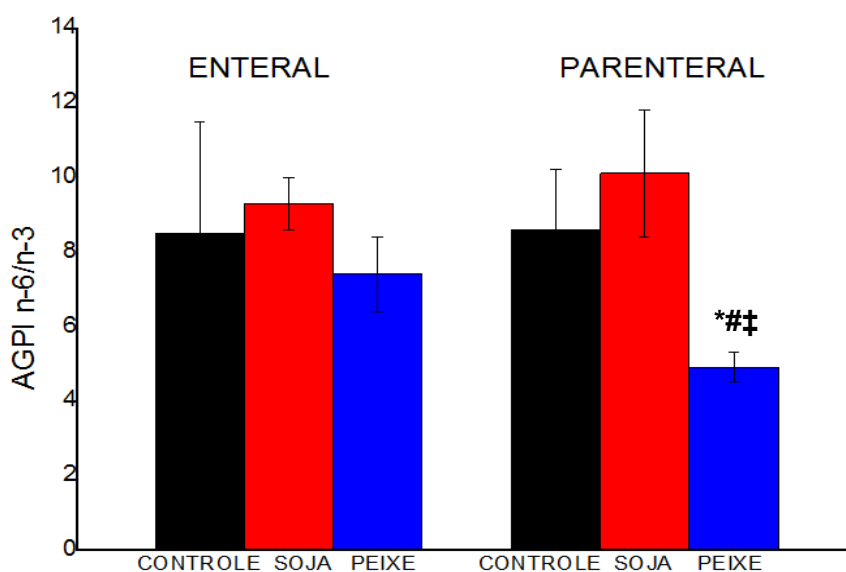


Figura 18. Relação entre o conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados da família n-6 e n-3 da fração de lípides neutros do tecido hepático de ratos suplementados com óleo de peixe e de soja pelas vias enteral e parenteral.

*p<0,05 comparado ao respectivo controle; # p<0,05 comparado ao grupo que recebeu emulsão de óleo de soja via parenteral; ‡p<0,05 comparado ao grupo que recebeu óleo de peixe via enteral.

4.3. Medida de lipoperoxidação hepática pelo índice TBARS

A Figura 25 mostra que os níveis de MDA no fígado avaliados pelo índice de TBARS (nmol/g tecido) não mostraram variações significativas ($p < 0,05$) após as suplementações (soja e peixe) por vias oral e parenteral quando comparados aos respectivos grupos controle. Foi possível observar que a suplementação com as duas emulsões lipídicas (soja e peixe) por via parenteral levaram a um pequeno incremento nos níveis de TBARS, embora não significantes devido ao alto valor de desvio padrão observado nos ensaios.

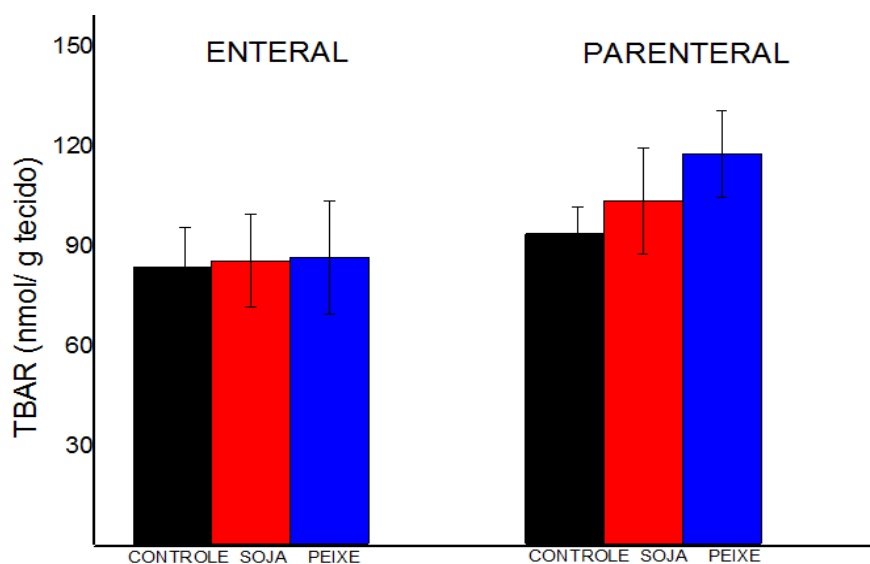


Figura 19. Medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em fígado de ratos dos grupos controle e suplementados com óleo de soja e peixe pelas vias oral e parenteral. Os dados representam a média \pm DP (n=3).

4.4. Atividade hepática das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)

A suplementação com os óleos soja e peixe por vias oral e parenteral não foi capaz de promover alterações significativas na atividade hepática das enzimas SOD e CAT como podemos observar nas Figuras 20 e 21. Pode-se observar que o tipo de suplemento (soja e peixe) e as duas vias de administração usadas (oral e parenteral) não promoveram alterações na atividade das enzimas antioxidantes.

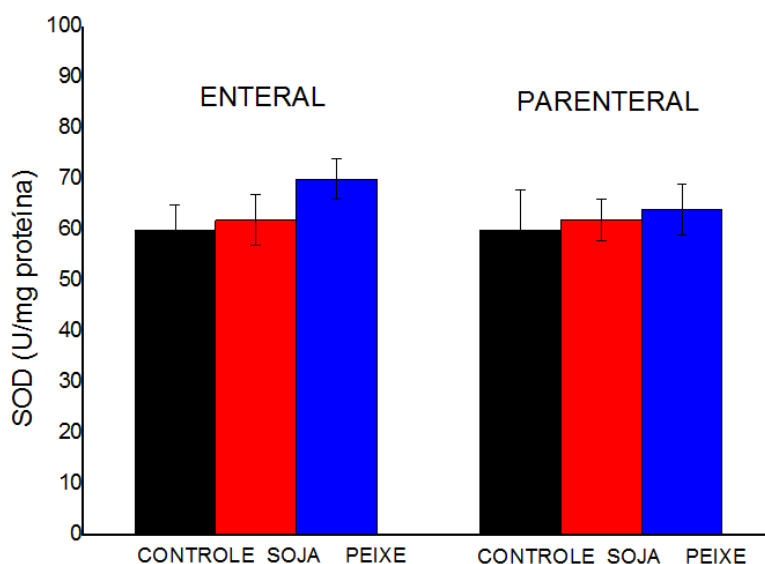


Figura 20. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em fígado de ratos dos grupos controle e suplementados com soja e peixe pelas vias oral e parenteral. Os dados representam a média \pm DP (n=3).

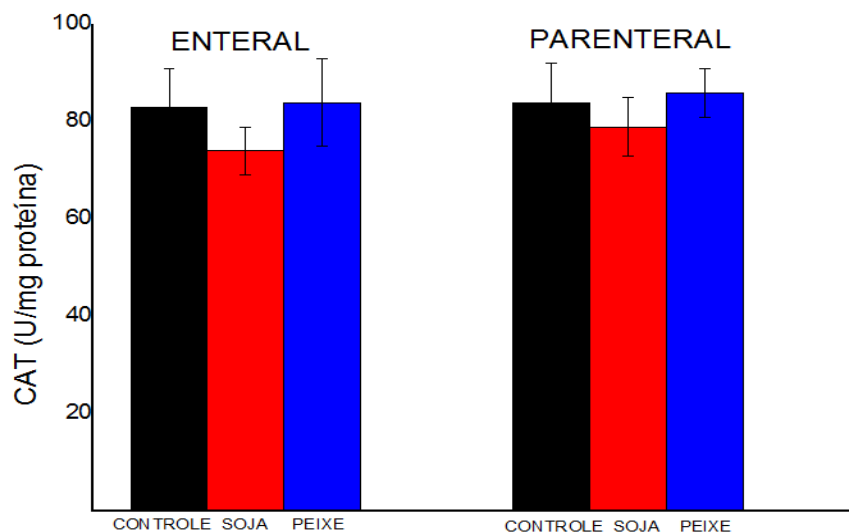


Figura 21. Atividade da enzima catalase (CAT) em fígado de ratos dos grupos controle e suplementados com soja e peixe pelas vias oral e parenteral. Os dados representam a média \pm DP (n=3).

4.5. Expressão proteica da $\Delta 6$ -dessaturase hepática (FADS2)

A figura 22 mostra a expressão da proteína FADS2, quantificada através da técnica de *western blot*, no fígado dos animais controle e suplementados com soja e peixe pelas vias enteral e parenteral.

A ilustração A desta Figura mostra as bandas da proteína FADS2 nas membranas de PVDF (fluoreto de polivinilideno) obtidas do fígado de animais suplementados com óleo de soja pela via enteral (1), controle (2) e com emulsão de óleo de soja pela via parenteral (2) e seu respectivo controle (4). A ilustração B da Figura mostra as bandas da proteína FADS2 obtidas com os animais suplementados com peixe e controle.

Na ilustração C, as barras representam a quantificação da intensidade de cada banda em relação à intensidade da banda de β -actina. Pode-se observar que não houve diferenças entre os grupos suplementados com óleo de soja e óleo de peixe pela via oral quando comparados entre si e em relação aos respectivos controles. Por outro lado, a expressão de FADS2 no fígado dos animais, de ambos os grupos (soja e peixe) que receberam a suplementação por via parenteral foi

significativamente inferior aos dados obtidos do respectivo controle e também em relação aos animais que receberam a suplementação pela via oral.

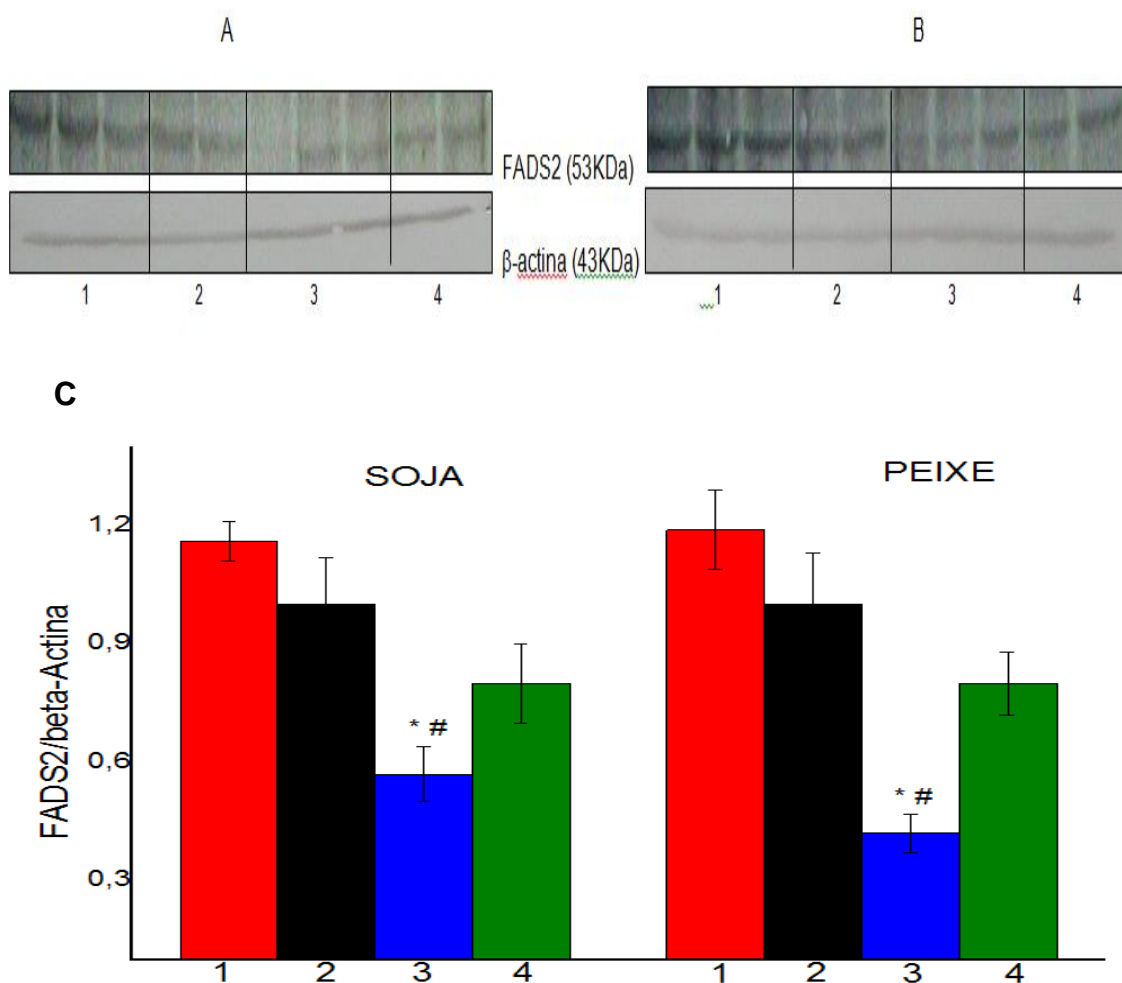


Figura 22. Expressão da $\Delta 6$ dessaturase (FADS2) no fígado dos animais controle e suplementados com soja e peixe pelas vias enteral e parenteral.

(A e B) Bandas na membrana da expressão $\Delta 6$ dessaturase (FADS2) do homogenato hepático de animais suplementados com soja (A) e com peixe (B) pela via enteral (1), controle enteral (2), via parenteral (3) e controle parenteral (4).

(C) Barras representam a quantificação da intensidade de cada banda em relação a intensidade da banda de β -actina, expressa em média e desvio padrão.

* $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo controle e # $p < 0,05$ quando comparado ao mesmo grupo tratado pela via oral.

4.6. Resposta do sistema oxidante-antioxidante dos animais suplementados com o concentrado de óleo de peixe

A tabela 12 mostra uma avaliação do sistema oxidante (TBARS) e do sistema antioxidante (CAT e SOD) dos animais que receberam suplementação com o concentrado de óleo de peixe comparado ao respectivo controle. Pode-se observar que no grupo tratado os níveis de TBARS deram superiores aos observados no controle, enquanto os níveis de CAT e SOD não mostraram alterações significativas.

Tabela 12. Resposta do sistema oxidante-antioxidante dos animais controle e aqueles suplementados com concentrado de óleo de peixe (0,2g/Kg de peso corpóreo)

	Grupo Controle	Grupo suplementado com concentrado de óleo de peixe
TBARS (nmol MDA/g tecido)	136,4±7,4	156,4±5,2*
SOD (U/mg proteína)	62,4±7,4	53,5±5,8
CAT (U/mg proteína)	87,3±3,9	89,3±9,2

Os dados representam a média ± DP (n=3). *p< 0,05 comparado ao controle.

4.7. Perfil de ácidos graxos hepático dos animais suplementados com o concentrado de óleo de peixe

A Tabela 13 mostra o perfil de ácidos graxos hepático dos animais que receberam a suplementação com o concentrado de óleo de peixe comparado ao controle. O uso deste suplemento promoveu alterações significativas nos níveis de AGPI n-3 nos lípides totais. Pode-se observar um aumento significativo dos níveis de EPA e de DHA comparado ao controle. O aumento dos níveis de AGPI n-3 nestes animais refletiu na redução significativa da razão entre os AGPIs n-6/n-3.

Tabela 13. Composição de ácidos graxos dos lípides totais do tecido hepático dos animais controle e suplementados com concentrado de óleo de peixe.

Ácidos graxos	Controle (salina)	Concentrado de óleo de peixe
16:0	27,64±1,15	26,96±3,23
18:0	10,95±1,07	8,85±2,64
∑ AGs saturados	38,59±1,85	35,81±2,45
16:1 n-7	1,80±0,30	1,95±0,75
18:1 n-9	11,57±1,23	13,43±1,97
∑ AGs monoinsaturados	13,37±1,15	15,38±0,94
18:2 n-6	23,55±2,32	27,43±2,17
20:4 n-6	15,09±2,43	13,54±1,94
∑ AGPIs n-6	38,64±1,54	40,97±1,35
18:3 n-3	1,13±0,57	0,98±0,26
20:5 n-3	0,23±0,06	0,42±0,06*
22:5 n-3	0,78±0,19	1,06±0,35
22:6 n-3	2,07±0,47	3,89±0,85*
∑AGPIs n-3	4,21±0,74	6,35±0,95*
∑AGPI n-6/∑ AGPI n-3	9,17±1,16	6,60±0,87*

Os dados representam a média ± DP (n=3). *p< 0,05 comparado ao controle

5. DISCUSSÃO

Grande número de trabalhos tem reportado que o tipo de ácido graxo dos óleos ou gorduras da dieta é capaz de influenciar de forma significativa a composição de ácidos graxos dos lípides de animais experimentais. Diferentes fontes de lípides, doses e forma estrutural como triacilglicerol, ésteres de ácidos graxos e fosfolípides tem sido utilizadas, o que muitas vezes dificulta a comparação entre os dados reportados.

Considerando o interesse médico e nutricional dos AGPIs da família n-3 em especial os EPA e DHA, é desejável que os lípides, em especial, os fosfolípides de membrana, apresentem alta capacidade de incorporar estes ácidos graxos da dieta. Por outro lado, também é conhecido que estes ácidos graxos são altamente susceptíveis a oxidação, podendo gerar radicais livres, peróxidos e hidroperóxidos cuja estrutura depende dos ácidos graxos presentes (Ramalho e Jorge, 2006).

O uso de antioxidantes tem sido uma estratégia importante usada para reduzir a lipoperoxidação em alimentos e em suplementos comerciais contendo óleo de primula (Gamaline V, Fortvitta, Nutraway) groselha negra (Fortvitta, Doctor Berge, Tiaraju), borago ou borragem (Stem, Nutraway, Schraiber), peixe (Fortivitta, Katiguá, Herbarium, Sundown) e fígado de bacalhau (Bionatus, Tiaraju, Maxinutri, ApisNutri). Os antioxidantes principais e mais utilizados são os do grupo de polifenóis, como BHA (butil-hidroxi-anisol), BHT (butil-hidroxi-tolueno), PG (propil galato) e TBHQ (terc-butil-hidroquinona) que são sintéticos, e os tocoferóis (Vitamina E), que são naturais (Ramalho e Jorge, 2006). A legislação brasileira permite a adição de 300 mg/kg de tocoferóis em óleos e gorduras, como aditivos intencionais, com função de antioxidante (ABIA, 1999).

Nossos resultados mostraram que a suplementação parenteral com emulsão de óleo de peixe altera de forma favorável a composição de ácidos graxos hepáticos, gerando lípides com altos níveis de EPA e DHA, precursores dos eicosanóides que atuam como moduladores de diversos processos biológicos. Nossos resultados mostraram ainda que o expressivo aumento do teor de AGPI n-3 nos lípides hepáticos não levou ao aumento da oxidação lipídica (avaliado pelo TBARS) e também não foi observado um efeito positivo no sistema de defesa antioxidante (CAT e SOD) dos animais. Por outro lado, o uso do concentrado de óleo

de peixe, enriquecido em AGPI n-3, não mostrou vantagens comparado ao óleo de peixe. Foi observado um aumento dos níveis hepáticos de TBARS no grupo de animais que receberam este suplemento por gavagem. O aumento nos níveis de oxidação no fígado, medido pelo TBARS, pode ser atribuído aos altos níveis de AGPIs presentes no concentrado do óleo de peixe, importante substrato para a rancidez oxidativa, e também ao tempo prolongado do processo de hidrólise (8 horas de reação) para a obtenção do concentrado de óleo de peixe. Estes fatores, associados à exposição a luz e oxigênio podem ter levado a geração de produtos de oxidação no suplemento preparado em laboratório. É importante enfatizar também que neste concentrado não foi adicionado nenhum antioxidante após seu preparo.

Os animais que receberam o concentrado de óleo de peixe também incorporaram significativas quantidades de EPA e DHA nos lípides hepáticos o que levou ao aumento da razão AGPI n-6/n-3 nos lípides deste grupo comparado ao controle. Embora estes animais tenham recebido maiores níveis de EPA e DHA (aproximadamente 40%) na dieta do que os animais que receberam óleo de peixe por gavagem (aproximadamente 30%), os níveis de incorporação dos AGPI não foram proporcionais às quantidades recebidas na dieta.

É importante ressaltar que o aumento da lipoperoxidação é dependente do tipo de óleo usado, da dose e vias de administração além da presença de antioxidantes nas formulações. Todas as preparações usadas neste trabalho continham antioxidantes em suas formulações (óleo de soja Liza®, óleo de peixe Naturalis®, emulsões lipídicas Omegaven® e Lipovenos®), exceto o concentrado de óleo de peixe preparado em laboratório. Na ausência de antioxidantes apropriados, os AGPIs formam radicais livres e podem ter um efeito pró-oxidante significativo levando à depleção da vitamina E e aumento dos produtos de oxidação (Meydani, 1996). Por este motivo, é desejável ter uma ingestão aumentada de antioxidantes para acompanhar um consumo elevado de AGPIs para obter as ações benéficas dos mesmos (Wiseman, 1996).

Nossos resultados confirmam os dados previamente reportados que a dieta é capaz de promover alterações significativas na composição dos ácidos graxos de tecidos de animais. Nassar *et al* (1986) mostraram que os animais tratados por 2 semanas com 10% da mistura de óleo de peixe (óleo marinho rico em EPA e DHA) e óleo de prímula (óleo vegetal rico em ácido linoleico e gama-linolênico), levou a

redução significativa de AA do fígado, levando a uma relação inversa entre a taxa de AA/dihomo-gama linolênico e os níveis de EPA. Estes resultados, segundo os autores sugerem que o EPA, e não o DHA exerce um efeito inibitório na conversão de dihomogama linolênico para AA.

Venkatraman *et al* (1998) reportaram o aumento significativo dos ácidos 18:3, 20:5, 22:5 e 22:6 na fração microsomal hepática de ratos suplementados com 10% de óleo de peixe adicionado a ração, enquanto os ácidos 14:0, 14:1, 18:1, 18:2 e 20:4 estavam aumentados nos animais suplementados com 10% de óleo de milho. Embora os autores mostrem uma alteração significativa na composição de ácidos graxos dependendo da dieta, esta não causou alteração nos níveis de oxidação, avaliado pelos níveis de TBARS no fígado dos animais. O grupo de animais que recebeu óleo de peixe e não foi submetido ao exercício físico (treinamento em escada rolante por 6 dias/semana durante 2 meses) foi observado uma redução da atividade das enzimas SOD e GSH-Px e um aumento da atividade da enzima CAT. Por outro lado, esta mesma suplementação em animais submetidos ao exercício levou a um incremento na atividade da GSH-Px, sugerindo que o óleo de peixe foi capaz de aumentar a defesa antioxidante.

Diferente dos resultados observados no nosso trabalho, Ruiz-Gutiérrez *et al* (1999) reportaram um aumento significativo na atividade hepática das enzimas CAT, SOD e GPx em animais que receberam dieta enriquecida com óleo de peixe, comparado ao grupo controle e aos grupos que receberam dietas ricas em ácido oléico (óleo de oliva e óleo de girassol). Os mesmos autores reportaram posteriormente que o aumento nos níveis de AGPI n-3 no fígado de animais hipertensos, a semelhança do observado nos normotensos no trabalho anterior, foi capaz de aumentar a defesa antioxidante dos animais, observado pelo aumento da atividade de CAT, SOD e GPx, sem nenhuma diferença na atividade da redutase citocromo-NADPH (Ruiz-Gutiérrez *et al*, 2001).

Dados semelhantes ao nosso foram reportados por Tu *et al* (2013) os quais não observaram aumento da susceptibilidade à oxidação, avaliados por TBARS, em animais que receberam suplementação com óleos de peixe (salmão, tuna, cavalinha). Os autores também observaram que a maior incorporação de ácidos graxos n-3 nos tecidos destes animais não refletiu no aumento dos níveis urinários

de PG e TX da série 2 e nem na expressão hepática das enzimas antioxidantes avaliadas por PCR em tempo real.

O aumento de biomarcadores de lipoperoxidação e de oxidação de proteínas avaliado no homogenato hepático foi relatado por Vigerust *et al* (2012) com o uso de uma dieta alta em gordura (25%) adicionado de 10% de óleo de peixe (contendo 4,5% de EPA e 2,3%) por 50 semanas de suplementação.

Feillet-Coudray *et al* (2013) alertaram sobre a precaução do uso farmacológico, envolvendo altas doses de AGPI n-3. Os autores observaram que altas doses de banha de porco e de óleo de peixe (30% de lípides totais, correspondente a 300g lípides/Kg peso corpóreo) administrados a ratos por 12 semanas, sem a presença de antioxidantes foram capazes de levar ao desenvolvimento de esteatose hepática e ao aumento da oxidação de lípides e proteínas no fígado dos animais. Adicionalmente os animais que receberam banha de porco apresentaram quadro de obesidade e resistência insulínica sem alteração do teor de lípides totais do músculo.

Poucos trabalhos tem reportado o efeito de emulsões lipídicas de óleo de peixe administradas por via parenteral. Hagi *et al* (2010) reportaram que a emulsão lipídica de óleo de peixe infundida nos animais por 3 dias consecutivos é capaz de levar a incorporação satisfatória de AGPIs nos fosfolípidos de membranas dos leucócitos polimorfonucleares. O aumento dos níveis da taxa EPA foram positivamente correlacionados com o aumento dos níveis da taxa LTB(5):LTB(4), usado como um eficiente indicador do efeito anti-inflamatório da emulsão.

Barros *et al* (2013) reportaram os níveis de incorporação dos ácidos graxos nas células (leucócitos e eritrócitos) e nos tecidos de ratos que foram suplementados com óleo de peixe ou óleo de soja por via oral e de emulsão lipídica a base de óleo de peixe ou emulsão de óleo de soja por via parenteral (0,2g/Kg/dia durante 3 dias). A suplementação com o óleo de peixe por via enteral levou ao aumento de EPA nos lípides totais do fígado e na fração de fosfatidilcolina plasmática, enquanto a suplementação com a emulsão lipídica de óleo de peixe por via parenteral levou a uma significativa incorporação de EPA, DHA e dos ácidos graxos n-3 totais nos lípides do fígado, dos leucócitos e na fração de fosfatidilcolina plasmática comparado ao grupo controle (solução salina) e ao grupo que recebeu emulsão de óleo de soja. No fígado, o EPA e o DHA estavam aumentados e a relação AA/EPA

reduzida nos animais que receberam emulsão lipídica a base de óleo de peixe comparado ao grupo controle.

O uso de microemulsões de óleo de peixe mostrou aumentar a biodisponibilidade de EPA e DHA nos lípides séricos de ratos que receberam a suplementação por via enteral por um período de 30 dias. Os autores relataram também um acréscimo de 71 e 41%, respectivamente, dos níveis de DHA no coração e cérebro dos animais que receberam a microemulsão comparado aos animais que receberam o óleo de peixe (Sugasini e Lokesh, 2013).

Nossos resultados mostraram ainda que a via de administração, mas não o tipo de óleo usado na suplementação, foi capaz de alterar a expressão da enzima $\Delta 6$ dessaturase (FADS2) sugerindo que o tipo de óleo usado na suplementação (soja e peixe) parece não interferir na expressão da FADS2 uma vez que os dois óleos contém ácidos graxos de 18C (ácido linoléico e linolênico), substratos para esta enzima.

Evidências anteriores mostraram que a síntese de AGPI é dependente em maior extensão da quantidade do substrato da enzima presente na dieta do que da expressão dos genes FADS1 e FADS2. Tu *et al* (2013) observaram um aumento nos níveis de EPA e DHA do plasma e fígado de animais que receberam dieta com ácido linolênico. Os níveis de DHA também aumentaram quando utilizada dieta padrão adicionada de ácido linolênico acima de 1% energia. Por outro lado, o uso de uma dieta com baixos teores de AGPI (0,4% energia) mostrou estimular a expressão da $\Delta 6$ dessaturase e da elongase 2 (ELOVL 2) quando comparada a dieta com altos teores de AGPI (6,6% energia).

Fatores hormonais mostraram também influenciar no metabolismo dos AGPI conforme relatado por Extier *et al* (2010). Os autores observaram maior expressão das dessaturases ($\Delta 4$, $\Delta 5$ e $\Delta 6$ dessaturase) e maiores níveis de DHA nos fosfolípidos do fígado de ratos fêmeas após a suplementação com ácido linolênico (20mg/100g de dieta).

6. CONCLUSÃO

Este trabalho contribui no sentido de promover evidências do efeito benéfico da emulsão de óleo de peixe na dose de 0.2g/kg/dia por três dias consecutivos em ratos saudáveis. Os resultados mostraram que a suplementação parenteral com a emulsão de óleo de peixe foi capaz de promover alterações favoráveis na composição de AGPIs dos lípides hepáticos, levando a maior incorporação de EPA e DHA nas membranas e nos lípides de reserva, sem levar a maior lipoperoxidação hepática. O uso via enteral, nas condições avaliadas no trabalho, não foi capaz de promover alterações favoráveis na razão AGPI n-6/AGPIs n-3. Por outro lado, o uso de concentrado de óleo de peixe, contendo altos teores de AGPIs, suplementado também pela via enteral, embora tenha mostrado favorável para aumentar os níveis de AGPIs nos lípides hepáticos levou desfavoravelmente ao aumento da lipoperoxidação. As suplementações avaliadas, peixe e soja, por ambas as vias, enteral e parenteral, mostraram não interferir na atividade das enzimas antioxidantes, SOD e CAT. Por outro lado, quando suplementadas pela via parenteral, as emulsões de óleo de soja e de peixe foram capazes de reduzir a expressão de FADS2, mostrando que a maior oferta de AGPIs na dieta interfere na síntese endógena destes compostos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIA, Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação; Compêndio da Legislação de Alimentos: **Consolidação das Normas e Padrões de Alimentos**, São Paulo: Ed. DBA, 2013. p. 28-30.

Agarwal, A.; Gupta, S.; Sharma, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reprod Biol Endocrinol**, 28(3):1-21, 2005.

Amstad, P.; Cerutti, P. Genetic modulations of the cellular antioxidant defense capacity. **Env Health Persp**, 88:77-82, 1990.

Ando, K.; Nagata, K.; Yoshida, R.; Kikugawa, K.; Suzuki, M. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on lipid peroxidation of rat organs. **Lipids**, 35(4):401-7, 2000.

Anschau, V; Laguer, F. Avaliação da taxa de peroxidação lipídica em ratos suplementados com óleo de peixe e óleo de fígado de tubarão, **Unoesc & Ciênc. ACBS**, 2(1):17-30, 2011.

AOCS, **American Oil Chemists' Society**. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society. 3ª edição. Washington, 1993. Disponível em <http://www.aocs.org/methods/index.cfm> Acesso em 30/02/2014.

Arisue, A.; Shimojima, N.; Tomiya, M.; Shimizu, T.; Harada, D.; Nakayama, M.; Tomita, H.; Shinoda, M.; Tanabe, M.; Maruyama, I.; Mizuno, M.; Kuroda, T.; Wakabayashi, G.; Morikawa, Y. Effect of n -3 lipid emulsion in reducing oxidative stress in a rat model of intestinal ischemia- reperfusion injury. **Pediatr Surg Int**, 28(9):913-8, 2012.

Arterburn, L. M.; Boswell, K.D.; Koskelo, E.; Kassner, S.L.; Kelly, C.; Kyle, D.J. A combined subchronic toxicity and neurotoxicity study of a single-cell source of docosahexaenoic acidtriglyceride (DHASCO oil). **Food Chem Toxicol**, 38(1):35-49, 2006.

Ashtiyani, S. C.; Najafi, H.; Kabirinia, K.; Vahedi, E.; Jamebozorky, L. Oral omega -3 fatty acid for reduction of kidney dysfunction induced by reperfusion injury in rats. **Iran J Kidney Dis**, 6(4):275-83, 2012.

Avramovic, N.; Dragutinovic, V.; Krstic, D.; Colovic, M.; Trbovic, A.; de Luka, S.; Milovanovic, I.; Popovic, T. The effects of omega 3 fatty acid supplementation on brain tissue oxidative status in aged *wistar* rats. **Hippokratia**, 16(3):241-5, 2012.

Bajka, B. H.; Clarke, J. M.; Cobiac, L.; Topping, D. L. Butyrylated starch protects colonocyte DNA against dietary protein-induced damage in rats. **Carcinogenesis**, 29(11): 2169-74, 2008.

Bargut, T. C.; Frantz, E. D.; Mandarim-de-Lacerda, C. A.; Aguila, M. B. Effects of a diet rich in n-3 polyunsaturated fatty acids on hepatic lipogenesis and beta-oxidation in mice. **Lipids**, 49(5): 431-44, 2014.

Barreiros, A.L.B.; David, J.M. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova**, 29(1):113-23, 2006.

Barros, K. V.; Carvalho, P. O.; Cassulino, A. P.; Andrade, I.; West, A. L.; Miles, E. A.; Calder, P. C.; Silveira, V. L. F. Fatty acids in plasma, White and red blood cells, and tissues after oral or intravenous administration of fish oil in rats, **Clin Nutr**, 32(6): 993-8, 2013.

Basu, S. Bioactive eicosanoids: role of prostaglandin F(2 α) and F₂-isoprostanes in inflammation and oxidative stress related pathology. **Mol Cells**, 30(5): 383-391, 2010.

Benatti, P.; Peluso, G.; Nicolai, R.; Calvani, M. Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. **J Am Coll Nutr**, 23(4): 281- 302, 2004.

Beutler, E. **Red cell metabolism: A manual of biochemical methods**. 2^o ed. London: Grune & Stratton, 1975, p 458 – 460.

Bianchi, M. L. P.; Antunes, L. M. G. Free radicals and the main dietary antioxidants, **Rev Nutr**, 12(2): 123-130, 1999.

Bose, K. S.; Agrawal, B. K. Effect of lycopene from tomatoes (cooked) on plasma antioxidant enzymes, lipid peroxidation rate and lipid profile in grade-I hypertension. **Asian J Infect Dis**, 51(5), 477-481, 2007.

Britton, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **Biochem J**, 9:1551-1558, 1995.

Brockerhoff, H.; Hoyle, R. J.; Hwang, P. C.; Litchfield, C. Positional distribution of fatty acids in depot triglycerides of aquatic animals. **Lipids**, 3(1): 24-9, 1969.

Brown, S. A.; Brown, C. A.; Crowell, W. A.; Barsant, J. A.; Kang, C. W.; Allen, T.; Cowell, C.; Finco, D. R. Effects of dietary polyunsaturated fatty acid supplementation in early renal insufficiency in dogs. **J Lab Clin Med**, 135(3): 275-86, 2000.

Burdge, G. C.; Jones, A. E.; Wootton, S. A. Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of alpha-linolenic acid metabolism in young men. **Br J Nutr**, 88(4):355-63, 2002.

Calder, P. C. Effects of fatty acids and dietary lipids on cells of the immune system. **Proc Nutr Soc**, 55(1B): 127-50, 1996.

_____. Dietary modification of inflammation with lipids. **Proc Nutr Soc**, 61(3): 345-58, 2002.

_____. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, 77(5-6): 327-35, 2007.

_____. The relationship between the fatty acid composition of Immune cells and their function. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, 79(3-5): 101- 8, 2008.

_____. Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. **Eur J Pharmacol**, 668(1): S50-8, 2011.

Calder, P.C.; Jensen, G. L.; Koletzko, B. V.; Singer, P.; Wanten, G.J. Lipid emulsions in parenteral nutrition of intensive care patients: current thinking and future directions. **Intensive Care Med**, 36(5): 735-49, 2010.

Campos, S. C.; Bortoloti, L. V.; Soares, V. C. G.; Santis, L. H.; Fagundes, F. H. R. Influência da suplementação com ácidos graxos n-3 no desenvolvimento do estresse oxidativo e camundongos. **Arq Gastroenterol**, 13(4):251-6, 2011.

Carvalho, P. O.; Campos, P. R. B.; Noffs, M. D. A.; Oliveira, J. G.; Shimizu, M. T.; Silva, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Quím Nova**, 26(1), 75-80, 2003.

Chung, K. F.; Marwick, J. A. Molecular mechanisms of oxidative stress in airways and lungs with reference to asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Ann N Y Acad Sci**, 1203, 85-91, 2010.

Clarke, S.D. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. **Br J Nutr**, 83: 559- 66, 2000.

Cossins, A.R.; Murray, P.A.; Gracey, A.Y.; Logue, J.; Polley, S.; Caddick, M.; Brooks, S.; Postle, T.; Maclean, N. The role of desaturases in cold-induced lipid restructuring. **Biochem Soc Trans**, 30(Pt 6):1082-6, 2002.

Curi, R.; Pompeia, C.; Miyazaka, C. K.; Procópio, J. **Entendendo a gordura os ácidos graxos**. São Paulo: Ed. Manole, 2002. p.10-42.

DeFilippis, A. P.; Sperlings, L. S. Understanding omega- 3' s **Am Heart J**, 151(3): 564- 70, 2006.

Dormandy, T. L. Antioxidants, vitamins and nutrients. In Guteridge, J.M.C. Halliwell. B. Antioxidant and nutrition, health and diseases. **New York Oxford**, University Press, 1994, p.63- 81.

Drôge,W. Free Radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, 82(1): 47-95, 2002.

Extier, A.; Langelier, B.; Perruchot, M. H.; Gesnet, P.; Veldhoven, P. P. V.; Lavielle, M.; Alessandri, J. M. Gender affects liver desaturase expression in a rat model of n-3 fatty acid depletion. **Biochem J**, 21: 180-7, 2010.

Feillet-Coudray C.; Aoun, M.; Fouret, G.; Bonafos, B.; Ramos, J.; Casas, F.; Cristol, J. P.; Coudray, C. Effect of long-term administration and saturated dietary n-3 fatty acid rich lipid utilization and on oxidative stress in rat liver and muscle tissues. **Br J Nutr**, 110 (10): 1789 – 802, 2013.

Fetterman, J. W. J.; & Zdanowicz, M. M. Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease. **Am J Health Syst Pharm**, 66(13): 1169-79. 2009.

Ferreira, A. L. A.; Matsubara, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, 43(11):61-8,1997.

Fischer, S. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoid formation in humans. **Adv Lipid Res**, 23: 169-96, 1989.

Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. **J Biol Chem**, 226(1): 497- 509, 1957.

Fridovich, I. Superoxide dismutases. **Annu Rev Biochem**, 44:147-59, 1975.

Giugliano, D.; Ceriello, A.; Esposito, K. The effects of diet on inflammation: emphasis on the metabolic syndrome. **J Am Coll Cardiol**, 48(4): 677- 85, 2006.

Grotto, D.; Santa Maria, L. D.; Boeira, S.; Valentini, J.; Charao, M. F.; Moro, A. M.; Nascimento, P. C.; Pomblum, V. J.; Garcia, S. C. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. **J Pharm Biomed Anal**, 43(2): 619-24, 2007.

Gunstone, F. **Fatty acids - nomenclature, structure, isolation and structure determination, biosynthesis and chemical synthesis**. In Fatty acid and lipid chemistry. Blackie Academic & Professional, Glasgow, 1996, p 1- 33.

Hagi, A.; Nakayama, M.; Shinzaki, W.; Hail, S.; Ohyanagi, H. Effects of the omega-6:omega-3 fatty acid ratio of fat emulsions on the fatty acid composition in cell membranes and the anti-inflammatory action. **JPEN**, 34(3): 263-70, 2010.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. The antioxidants of human extracellular fluids. **Arch Biochem Biophys**, 280(1):1-8, 1990.

Halliwell, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem Soc Trans**, 35(Pt 5):1147-50.2007.

Harbige, L.S. Dietary n-6 and n-3 fatty acids in immunity and autoimmune disease. **Proc. Nutr. Soc**, 57(4): 555-62, 1998.

Hirvonen, T.; Virtamo, J.; Korhonen, P.; Albanes, D.; Pietinen, P. Intake of flavonoids, carotenoids, vitamins C and E, and risk of stroke in male smokers. **Stroke**, 31: 2301-6, 2000.

Igarashi, M.; Chang, L.; Ma, K.; Rapoport, S.L. Kinetics of eicosapentaenoic acid in brain, heart and liver of mice fed a high aware n-3 PUFA containing diet, **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, 89(6): 403 -12, 2013.

Innis, S. M.; Pink, V.; Jacobson, K. Dietary lipids and intestinal inflammatory disease. **J Pediatr**, 1(49): S89-S96; 2006.

Jacob, R. A. The integrated antioxidant system. **Clin Nutr Res**, 15(5): 755-66, 1995

Jakobsson, A.; Westerberg, R.; Jacobsson, A. Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. **Prog Lipid Res**, 45(3): 237-49, 2006.

Kelley, N. S.; Yoshida, Y.; Erickson, K. L. Do n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Increase or Decrease Lipid Peroxidation in Humans? **Metab Syndr Relat Disord**.12(8):403-15, 2014.

Kinsella, J.E. Alpha-Linolenic acid: Function and effects on linoleic acid metabolism and eicosanoid - mediated reactions. **Adv Food Nutr Res**, 35: 1-184, 1991.

Kramer, J.A.; LeDeaux, J.; Butteiger, D.; Young, T.; Crankshaw, C.; Harlow, H.; Kler, L.; Bhat, B. G. Transcription profiling in rat liver in response to dietary docosahexaenoic acid implicates stearyl- coenzyme a desaturase as a nutritional target for lipid lowering. **J Nutr**, 133(1): 57-66, 2003.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, **Nature**, 227(5259): 680-5, 1970.

Lands, W. E. M. **Fish, omega-3 and human health**. Champaign: American Oil Chemists` Society Press, 2005. p 220.

Lasheras, C.; Gonzalez, S.; Huerta, J.M.; Lombardia, C.; Ibañez, R.; Patterson, A. M.; Fernandez, S. Food habits are associated with lipid peroxidation in an elderly population. **J Am Diet Assoc**, 103(11): 1480-7, 2003.

Levy, J. R.; Clore, J. N.; Stevens, W. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids decrease hepatic triglycerides in Fischer 344 rats. **Hepatology**, 39(3): 608- 16, 2004.

Liu, J.; Yeo, H. C.; Doniger, S. J.; Ames, B. N. Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared to thiobarbituric acid. **Anal Biochem**, 245(2):161-6, 1997.

Lombardo, Y.B.; Chicco, A. G. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dislipidemia and insulin resistance in rodentes and humans. A review. **J Nutr Biochem**, 17(1):1-13, 2006.

Los, D.A.; Murata, N. Structure and expression of fatty acid desaturases. **Biochim Biophys Acta**, 1394(1): 3-15, 1998.

Luz, G.; Silva, S.; Marques, S.; Luciano, T. F.; Souza, C. T. Suplementação de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 reduz marcadores inflamatórios e melhora a ação da insulina em fígado de camundongos. **Rev Nutr**, 25(5):621-9, 2012.

Manku, M. S.; Morse-Fisher, N.; Horrobin, D.F. Changes in human plasma essential fatty acid levels as a result of administration of linoleic acid and gamma-linolenic acid. **Eur J Clin Nutr**, 42(1): 55-60, 1988.

Masuev, K. A. The effect of polyunsaturated fatty acids of the omega-3 class on the late phase of the allergic reaction in bronchial asthma patients. **Ter Arkh**, 69(3): 31-33, 1997.

Martin, C. A.; Almeida, V. V.; Ruiz, M. R.; Visentainer, J. E. L.; Matshushita, M.; Souza, N. E.; Visentainer, J. V. Ácidos Graxos Poliinsaturados ômega 3 e ômega 6: Importância e ocorrência em alimentos. **Rev Nutr**,19(6): 761- 70, 2006.

Mayne, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **J Nutr**, 133: 933S-940S, 2003.

Melo, J. U. S.; Santos, J. M. V.; Kimura, O. S.; Campos, M. M.; Melo, R. B.; Vasconcelos, P. R. L. Efeito dos ácidos graxos sobre a regeneração hepática em ratos, **Rev Col Bras Cir**, 37(5): 351-357, 2010.

Meydani, S.N. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on cytokine production and their biologic function. **J Nutrition**, 12:S8-S14, 1996.

Meyer, A. H.; Kirsch, H.; Domergue, F.; Abbadi, A.; Sperling, P.; Bauer, J.; Cirpus, P.; Zank, T. K.; Moreau, H.; Roscoe, T. J.; Zähringer, U.; Heinz, E. Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis. **J Lipid Res**, 45(10): 1899-1909, 2004.

Minazzi-Rodrigues, R. S.; Penteadó, M. V. C. Importância dos óleos de peixe e nutrição humana. **Cad Nutr**, 3: 41-97, 1991.

Muehlmann, L. A.; Zanata, A. L.; Farias, C. I.; Bieberbach, E. W.; Mazzonetto, A. C.; Michellotto, P. V. Jr.; Fernandes, L. C.; Nishiyama, A. Dietary supplementation with soybean lecithin increases pulmonary PAF bioactivity in asthmatic rats. **J Nutr Biochem**, 21(6): 532-7, 2010.

Muralidhara, K.M.D.J. Enhanced neuroprotective effect of fish oil in combination with quercetin against 3 – nitropropionic acid induced oxidative stress in rat brain, **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 10: 83-92, 2012.

Nassar, B. A.; Huang, V. S.; Manku, M. S.; Das, U. N.; Horrobin, D. P. The influence of dietary manipulation with n-3 and n-6 fatty acids on liver and plasma phospholipid fatty acids in rats. **Lipids**, 21(10):652-6, 1986.

Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, 95(2): 351-8, 1979.

Owen, R.W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Haubner, R.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. **Eur J Cancer**, 36(10): 1235-1247, 2000.

Pal,C.; Uday,B. Redox-Active antiparasitic drugs. **Antioxid Redox Signal**,17(4): 555-582, 2012.

Perini, J. A. L.; Stevanato, F. B.; Sargi, S. C.; Visentainer, J. E. L.; Dalalio, M. M. O.; Matshushita, M.; Souza, N. E.; Visentainer, I. V. Ácidos graxos poliinsaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune, **Rev Nutr**, 23(6):1075-86, 2010.

Petean, C.C.; Gomes, F. M.; Rosa e Silva, J.C.; Ferriani, R. A.; Moura, M.D.; Reis, R. M.; Navarro, P.A.A.S. Peroxidação lipídica e vitamina E no soro e no fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose submetidas à estimulação ovariana controlada. **Rev Bras Ginec Obst**, 29(6):303-9, 2007.

Polley, S.D.; Tikku, P.E.; Trueman, R.T.; Caddick, M.X.; Morozov, I.Y.; Cossins, A.R. Differential expression of cold- and diet-specific genes encoding two carp liver $\Delta 9$ -acyl-CoA desaturase isoforms. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 284(1):R41-R50, 2003.

Popovic, T.; Borozan, S.; Arsic, A.; Martačić, J.D.; Vučić, V.; Trbović, A.; Mandić, L.; Glibetić, M. Fish oil supplementation improved liver phospholipids fatty acid composition and parameters of oxidative stress in male wistar rats, **J Anim Physiol Anim Nutr**, 96(6): 1020-9, 2012.

Ramalho, V. C.; Jorge, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quím Nova**, 29(4): 755-60, 2006.

Ramakrishnan, S.; Rajesh, M.; Sulochana, K. N. Eales' disease: oxidant stress and weak antioxidant defence. **Indian J Ophthalmol**, 55(2). p.95-102, 2007.

Randox- Ransod, Superoxide Dismutase Kit, RX DAYTONA. Disponível em http://www.lovmand.com/files/Randox-Kit-Inserts/SD125_Daytona.pdf . Acesso em 13/12/2012.

Reyes, G. C.; Sánchez, I. R.; Calzada-Mendonza, C. C.; Olivares-Corichi, I. M. Disfunción endotelial y estrés oxidativo. **Rev Endocrinol Nutr**, 14(4): 233-6, 2006.

Rice-Evans, C.; Bourdon, R. Free radical lipid interaction and their pathological consequences. **Prog Lipid Res**, 12: 71-110, 1993.

Rodacki, L.; Rodacki, A. L.; Pereira, G.; Naliwaiko, K.; Coelho, I.; Pequito, D.; Fernandes, L.C. Fish oil supplementation enhances the effects of strength training in elderly women. **Am J Clin Nutr**, 95(2): 428-36, 2012.

Rover, L. Jr.; Höehr, N. F.; Velasco, A. P. Sistema Antioxidante Envolvendo o Ciclo Metabólico da Glutaciona Associado a Métodos Eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim Nova**, 24(1):112-9, 2001.

Ruiz-Gutiérrez, V.; Perez-Espinosa, A.; Vázquez, C. M.; Santa-Maria, C. Effects of dietary fats (fish, olive and high oleic acid sunflower oils) on lipid composition and antioxidant enzymes in rat liver. **Br J Nutr**, 82(3): 233 – 41, 1999.

Ruiz-Gutiérrez, V.; Vázquez, C. M.; Santa-Maria, C.. Liver lipid composition and antioxidant enzyme activities of spontaneously hypertensive rats after ingestion of dietary fats (fish, olive and high oleic sunflower oils). **Biosci Resp**, 21(3): 271 – 85, 2001.

Ruxton, C. H.; Reed, S. C.; Simpson, M. J.; Millington, K. J. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids a review of the evidence. **J Nutr Diet**, 17(5): 449- 59, 2004.

Ruxton, C. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids a review of the evidence. **J Nutr Diet**, 20(3):275-85, 2007.

Sala, A.; Recio, M.; Giner, R.M.; Mañez, S.; Tournier, H.; Schinella, G.; Rios, J. L. Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichryssum italicum*. **J Pharm Pharmacol**, 54(3): 365-71, 2002.

Saidi, S.; Abdelkafi, S.; Jbahi, S.; Van Pelt, J.; El-Feki, A. Temporal changes in liver antioxidant enzyme activities after ischemia reperfusion in a model of liver ischemia in rats. effects of dietary fish oil. **Hum Exp Toxicol**, 16, 2014.

Schmitz, G.; Ecker, J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. **Prog Lipid Res** 47: 147-55, 2008.

Shen, H.; Kuo, C. C.; Chou, J.; Delvolve, A.; Jackson, S. N.; Post, J.; Woods, A. S.; Hoffer, B. J.; Wang, Y.; Harvey, B. K. Astaxanthin reduces ischemic brain injury in adult rats. **FASEB J**, 23(6): 1-11, 2009.

Sies, H.; Jones, D.P. **Oxidative stress**. In: Encyclopaedia of stress. Ed: Fink G. San Diego, Elsevier, 2007,p.45-48.

Simopoulos, A.P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. **J Am Coll Nutr**, 21(6): 495- 505, 2002.

Simopoulos, A. P. Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acid Ratio: The Scientific Evidence. **World Rev Nutr Diet Basel, Karger**, 2:92-95, 2003.

Smith, W. L. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. **Biochem J**, 259: 315- 324, 1989.

Sugassini, D.; Lokesh, B. R. Enhanced incorporation of docosahexaenoic acid in serum, heart, and brain of rats given microemulsions of fish oil. **Mol Cell Biochem**, 382(1-2): 203-216, 2013.

Sugihara, N.; Tsuruta, Y.; Date, Y.; Furuno, K.; Kohashi, K. High peroxidative susceptibility of fish oil polyunsaturated fatty acid in cultured rat hepatocytes. **Toxicol Appl Pharmacol**, 126(1): 124-128, 1994.

Surette, M. E. The science behind dietary omega 3 fatty acids. **CMAJ**, 178(2): 177-180, 2008.

Takeda, S.; Bando, N.; Yamanishi, R. Ingested beta-carotene enhances glutathione level and up-regulates the activity of cysteine cathepsin in murine splenocytes. **Biosci Biotechnol Biochem**, 72(6): 1595-600, 2008.

Technical Bulletin Catalase Assay Kit, Catalog Number CAT 100. Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/cat100bul.Par.0001.File.tmp/cat100bul.pdf> . Acesso em 18/06/2013.

Thomson, C.A.; Stendell-Hollis, N.R.; Rock, C.L.; Cussier, E. C.; Flatt, S. W.; Pierce, J. P. Plasma and dietary carotenoids are associated with reduced oxidative stress in women previously treated for breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomark Prev**, 16(10):2008-15, 2007.

Tou, J. C.; Altman, S. N.; Giglicti, J. C.; Benedito, V. A.; Cordonier, E. L. Different sources of omega 3 polyunsaturated fatty acids affects apparent digestibility, tissue deposition, and tissue oxidative stability in growing female rats. **Lipids Health Dis**, 14: 10-17, 2011.

Trueman, R.J.; Tiku, P.E.; Caddick, M.X.; Cossins, A.R. Thermal thresholds of lipid restructuring and delta(9)-desaturase expression in the liver of carp (*Cyprinus carpio* L.) **J Exp Biol**, 203: 641-50, 2000.

Tu, W. C.; Cook-Johnson, R. J.; James, M. J.; Mühlhäusler, B. S.; Gibson, R. A. Omega 3 long chain fatty acid synthesis is regulated more by substrate levels than gene expression. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, 83(2): 61-8, 2013.

Uttara, B.; Singh, A.V.; Zamboni, P.; Mahajan, R. T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Cur Neuropharmacol**, 7: 65-74, 2009.

Vasconcelos, S. M.L.; Goulart, M.O. F.; Moura, J. B. F.; Manfredini, V.; Benfato, M. S.; Kubota, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova**, 30: 1323-1338, 2007.

Vaughan, V. C.; Hassing, M. R.; Lewandowski, P. A. Marine polyunsaturated fatty acids and cancer therapy. **Br J Cancer**, 108(3): 486-492, 2013.

Venkatraman, J. T.; Angkeow, P.; Satsangi, N.; Fernandes, G. Effects of dietary n-6 and n-3 lipids on antioxidant defense system in livers of exercised rats. **J Am Coll Nutr**, 17(6): 586-594, 1998.

Vigerust, N. F.; Cacabelos, D.; Burri, L.; Berge, K.; Wergedahl, H.; Christensen, B.; Portero-Otin, M.; Viste, A.; Pamplona, R.; Berge, R. K.; Bjørndal, B. Fish oil fatty acids and tetradecylthioacetic (TTA) has an additive effect on lipid metabolism but antagonistic effects on oxidative damage in feeding rats for 50 weeks. **J Nutr Biochem**, 23 (11): 1384-1393, 2012.

Winterbourn, C. C.; Kettle, A. J. Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. **Biochem Biophys Res Commun**, 305: 729-36, 2003.

Wiseman, H. Dietary influences on membrane function: importance in protection against oxidative damage and disease. **J Nutr Biochem**, 7: 2-15, 1996.

Yaqoob, P.; Calder, P. C. Fatty acids and immune function: new insights into mechanisms. **Br J Nutr**, 1: 41-45, 2007.

Yi, D.; Zeng, S.; Guo, Y. A diet rich in n-3 polyunsaturated fatty acids reduced prostaglandin biosynthesis, ovulation rate, and litter size in mice. **Theriogenology**, 78(1): 28-38, 2012.

Yu, B P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol Rev**, 74: 139-61, 1994.

Yun-Zhong, F.; Sheng, Y.; Guoyao, W. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Nutrition**, 18: 872-879, 2002.