

Efeito de Dietas Suplementadas com Sardinha em Conserva vs Licopeno na Prevenção da Obesidade e da Doença Cardiovascular em Ratos Wistar

Cristina Isabel Carlos Ramos

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para a obtenção do
Grau de Mestre em Biotecnologia

Orientada por

Isabel Cristina F.R. Ferreira

Narcisa Maria Bandarra

Co-Orientada por

José Manuel Mestre Prates

Bragança

2010

Em memória do meu PAI e do meu Irmão Dinis,

Carta a um amigo - 1.º aniversário do falecimento do meu PAI (6 de Maio de 2010)

...,

Nós temos em comum o facto de sermos filhos de pessoas especiais. Não é qualquer Pai e Mãe que “abraçam” a tarefa de dar vida, voz, personalidade, formação pessoal e profissional, coragem e abdicam de ter uma vida social e familiar segundo o protótipo. Agradeço a Eles e a Deus por tudo o que fizeram por mim e pelos meus irmãos, apesar de nem tudo ser um mar de rosas..., sim os espinhos existiram e as tempestades também, mas contribuíram sem dúvida para o **Ser** que hoje **Sou**.

Com o meu Pai, aprendi a **respeitar o próximo**, a ser **honesto**, a conhecer a **paz interior**, a **olhar em frente** mesmo quando o caminho envolve **esforço, dedicação, a ter Deus presente em mim e na minha vida e acima de tudo**, por muito que seja o **ruído**, ter a noção de que é preciso não perder o nosso **rumo** (Personalidade).

Podes não acreditar, mas a maior parte do processo de aprendizagem foi-me transmitido através do seu **silêncio**, dos seus **exemplos**. Mas a maior lição, foi após a sua morte: sempre vi o meu Pai com uma pessoa **discreta, simples**, eu diria bastante **humilde**, ser **exaltado ...**

Penso que pelo que conheces de mim, não aches que estou a exagerar, mas apenas a partilhar alguns **pensamentos e sentimentos...**”.

Recordo o dia em que o meu PAI esteve em Bragança no dia da minha Bênção de Finalista, a alegria/orgulho que d’Ele irradiava, ..., lamento que ele não tenha chegado a esta etapa da minha vida, **uma etapa que ele viu começar**, mas é mais uma, das muitas em que ele não está presente fisicamente, mas certamente onde quer que esteja, ele continua a fazer parte da minha vida, a ser o meu “Anjo da Guarda”, a **transmitir-me a serenidade e sensatez necessária para olhar em frente**.

Do **Dinis**, recordo não só os seus últimos momentos em que ele me escolheu para estar com ele na sua partida, como todos em que eu era ainda uma criança quando ele me pegava ao colo e ensinou as primeiras notas de música e a tocar órgão. Permitiu desse modo para que a **música** fizesse parte da minha vida...

A ti, PAI **agradeço tudo**, e todas as palavras não **expressam** o que me vai na **alma**
e no **coração...**

“Talvez tenha herdado do meu PAI, o tal silêncio e não manifestar os meus sentimentos e gestos”...

A todos eu agradeço, em especial às pessoas que estiveram directamente ligadas a mim neste trabalho e nesta etapa:

À Doutora **Narcisa Bandarra** do INRB/L-IPIMAR, por ser a pessoa que **É**, por estar do meu lado em todas as etapas deste trabalho por que ambas passamos, pela sua **cumplicidade**, **carinho**, pela **amizade** que tem demonstrado e pela **orientação**;

À Professora **Isabel C.F.R. Ferreira** da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, pela sua **disponibilidade**, **eficiência**, **orientação**, apesar de não me conhecer pessoalmente, **aceitou** e **acreditou** nas minhas capacidades, pelo seu **apoio** a todos níveis;

Ao Professor Doutor **José M.M. Prates** da Faculdade de Medicina Veterinária, pela sua **disponibilidade** e **agrado** meu tê-lo como **co-orientador**, e pelo modo como toda a sua equipa: a **Dr.ª Paula Lopes**, a **Dr.ª Susana Martins** e a **Dr.ª Cristina Alfaia** me receberam, e apoiaram no decorrer deste trabalho;

Ao Doutor **Rogério Mendes** do INRB/L-IPIMAR, pela sua **paciência**, **acompanhamento** e **ensinamentos**, e à **Diana Duarte** a ajuda na recta final deste trabalho;

À Engenheira **Maria Leonor Nunes** do INRB/L-IPIMAR, pelo seu **profissionalismo** e pela sua **energia**, permitindo que este trabalho se realizasse na Unidade de Valorização dos Produtos da Pesca e Aquicultura da qual é directora;

À **D. Júlia Ferreira** do Laboratório de Nutrição do INRB/L-IPIMAR pelo seu **apoio** na fase inicial deste trabalho, **amizade**, e pelos **bons momentos** que **partilhamos** e continuamos a partilhar como colegas de trabalho;

A todos os meus colegas do IPIMAR e do laboratório Geral - Engenheira **Carla Pires** e em especial ao Engenheiro **Carlos Cardoso**, por estar **presente**, e pela **colaboração** demonstrada durante o Mestrado;

À Doutora **Maria João Coelho Sousa**, pela sua **amizade** desde os meus tempos de estudante e que **ambas soubemos cultivar** de Norte a Sul do país ao longo dos tempos, por todo o **apoio** que prestou durante esta etapa, por mais que eu escreva a seu respeito não consigo **demonstrar** tão **Grandiosa** ajuda e **Gratidão**, e apague da **memória** o avançado das horas a que eu chegava a sua casa ..., À **Ália** por me ceder o quarto e a cama e por ser a criança **“Linda”** e **Tranquila** que **É**;

À Doutora **Anabela Martins** da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, por toda a **“Garra”** transmitida e por ser uma **Professora** que **dignifica** o ensino, por **continuar** sempre disponível e nas minhas **memórias**, **Admiro-a**;

À **Titi**, que tem dedicado ao **longo de sua vida** o sentido e o sentimento de ser **madrinha**, ou seja, segunda mãe, por todo o seu **apoio a todos os níveis**. Ao meu irmão **João** e **padrinho** pela sua **serenidade**, por me **aceitar** e **respeitar** como Sou;

À minha **Mãe**, por ser uma **mulher de armas**, nem mesmo quando o seu coração estava despedaçado e o seu **“corpo”** dorido pela perda d’Filho e Marido se **esqueceu** dos outros **10 Ramos** e não **baixou os braços**. Aprendi ainda que **“quantas vezes Ela canta com vontade de chorar”**...;

Às minhas irmãs, em especial à **Maria do Céu** por **estar sempre presente**, pela sua **calma** e por ser um **Ser disponível** aos outros, não só, mas especialmente aos domingos à tarde para me levar ao comboio de volta a Lisboa e às sextas de regresso a Casa. À **Helena** por ser a **minha Gémea**, pela sua **independência** e pelo **apoio** nas diferentes fases da minha vida, à **MariaNita** pela sua **energia**, **jovialidade** e **coragem**. A todas **tenho** como **Amigas** e têm **lugar cativo** no meu **coração**, na minha **vida**.

Aos meus **sobrinhos**, em especial os que nutrem por mim o mesmo sentimento que eu por eles, Eles sabem quem são;

Aos **amigos** de sempre e **para sempre**, por me darem a **honra de partilhar** as suas **vidas** e por me ajudarem a **crescer** como **pessoa**: (ordem alfabética) **Ana**, **Bárbara**, **Ermelinda**, **Hugo**, **Ivone**, **Joana**, **Magi**, **Maria**, **Mariana**, **Marisa**, **Marta**, **Orlando**, **Susana** e **Vitória**.

Nota Prévia

Na elaboração desta dissertação, foi usada uma pequena parte dos resultados obtidos no âmbito do projecto “Rationale and Options in Dietary Use of Canned Sardines in Olive Oil and Tomato (Omega3, Lycopene, and Oleic acid) Related to Inflammatory and Athero-thrombogenic Biomarkers in Obesity and Metabolic Syndrome” financiado pela FCT (PTDC/SAU/70560/2006). Este projecto tinha como principal objectivo avaliar os principais benefícios para a saúde (prevenção da doença cardiovascular e tratamento da obesidade) de um consumo regular de produtos da pesca, ricos em ácidos gordos ómega 3, no índice ómega 3 dos fosfolípidos (humano e do rato), em componentes sanguíneos (humano e do rato) e em diferentes tecidos (no rato). Assim, apenas os resultados relativos ao perfil de ácidos gordos e carotenóides (no rato) se encontram neste documento. Acrescenta-se ainda que estes resultados fazem parte de um trabalho multidisciplinar que envolveu vários elementos pertencentes à Faculdade de Ciências Médicas da UNL, Faculdade de Medicina Veterinária da UTL e INRB/IPIMAR.

ABSTRACT

The main objective of this study was to evaluate the effect of diets based on long-chain fatty acids, omega 3 (ω 3) and omega (ω 6), particularly EPA (eicosapentaenoic acid), DHA (docosa-hexaneic) and AA (araquidonic acid) for the prevention of obesity and cardiovascular disease.

Diets were supplemented with canned sardines and the percentage of EPA, DHA and the ratio ω 3/ ω 6 in liver, erythrocytes, and adipose tissue of Wistar rats was determined. It was introduced a natural antioxidant that exists in the tomato, the lycopene, with the main objective to increase the beneficial effects of ω 3 and ω 6 fatty acids.

The increased supplementation of sardines promotes the decrease of AA decreased in liver, erythrocytes, and adipose tissue.

The increased supplementation of sardine (25 and 50%) promotes the increased level of EPA and the ω 3/ ω 6 index in liver, erythrocytes and adipose tissue.

The percentage of DHA increased significantly only in liver, erythrocytes and adipose tissue, with addition of 25% sardine.

The incorporation of lycopene supplementation in the diets did not show any interference on the fatty acids, however, increased fatty acid supplementation of ω 3 PUFA (50% sardine) decreases the incorporation of lycopene in the liver.

The diet supplemented with 25% sardine and lycopene appears to have a greater effect on cardiovascular diseases and prevention of breast and prostate cancer, because it ensures the optimal level of EPA, DHA and lycopene, all of them compounds/nutrients/substances favourable to health, particularly with scientific evidence supporting their benefits for the prevention for this diseases

RESUMO

O presente trabalho teve como principal objectivo avaliar o efeito de dietas suplementadas à base de ácidos gordos de cadeia longa, ómega 3 (ω 3) e ómega (ω 6), nomeadamente EPA (ácido eicosapentaenóico), DHA (ácido docosa-hexaneóico) e AA (ácido araquidónico), na prevenção da obesidade e doença cardiovascular.

Para tal, utilizaram-se dietas suplementadas com sardinhas em conserva e determinou-se a percentagem de EPA, DHA e da razão ω 3/ ω 6 nos eritrócitos, fígado e no tecido adiposo de ratos Wistar. Para maximizar os efeitos benéficos dos ácidos gordos ω 3 e ω 6, foi introduzido na dieta o licopeno que é um antioxidante natural que existe no tomate.

Verificamos que o AA diminuiu no fígado, nos eritrócitos e no tecido adiposo, face ao aumento da suplementação da sardinha.

O EPA e a razão ω 3/ ω 6 aumentaram no fígado, nos eritrócitos e no tecido adiposo, devido ao aumento da suplementação da sardinha (25 e 50%).

A percentagem de DHA aumentou significativamente apenas no fígado, nos eritrócitos e no tecido adiposo, com a suplementação de 25% sardinha.

A incorporação de licopeno nas dietas não evidenciou qualquer tipo de interferência com os ácidos gordos, no entanto, o aumento da suplementação de ácidos gordos PUFA ω 3 (50% sardinha) diminuiu a incorporação do licopeno no fígado.

A dieta suplementada com 25% sardinha e licopeno assegura níveis óptimos de EPA, DHA e licopeno, e parece apresentar maior efeito nas doenças cardiovasculares e na prevenção do cancro da próstata e mamário.

Índice

Nota Prévia.....	iv
ABSTRACT	v
RESUMO	vi
Índice	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xii
I. INTRODUÇÃO	13
1.1. Obesidade e Doenças Cardiovasculares.....	13
1.2. Efeitos benéficos dos ácidos gordos ω 3 e ω 6 na prevenção de doenças cardiovasculares.....	15
1.2.1. Ácidos gordos - Aspectos bioquímicos	15
1.2.2. Ácidos gordos ω 3 e ω 6	17
1.2.3. Relação dos ácidos gordos ω 3 e ω 6	23
1.3. Efeitos benéficos do licopeno na prevenção de doenças cardiovasculares.....	24
1.4. Objectivos.....	26
II. MATERIAL e MÉTODOS	27
2.1. Produtos químicos	27
2.2. Delineamento experimental das dietas.....	27
2.3. Avaliação dos ácidos gordos e do licopeno das dietas	28
2.3.1. Determinação do perfil de ácidos gordos	28
2.3.2. Determinação do licopeno.....	29
2.4. Avaliação dos ácidos gordos e do licopeno no fígado, tecido adiposo e nos eritrócitos	30
2.4.1. Selecção, colheita e preparação do fígado, tecido adiposo e dos eritrócitos após o abate	30
2.4.2. Determinação dos ácidos gordos.....	30
2.4.3. Determinação do licopeno.....	31

2.5. Análise Estatística	31
III RESULTADOS e DISCUSSÃO	33
3.1. Avaliação dos ácidos gordos e licopeno das dietas.....	33
3.1.1. Determinação do perfil de ácidos gordos	33
3.1.2. Determinação do licopeno.....	35
3.2. Avaliação dos ácidos gordos e do licopeno no fígado, tecido adiposo e nos eritrócitos	36
3.2.1 Determinação dos ácidos gordos no fígado	36
3.2.2 Determinação dos ácidos gordos no tecido adiposo	40
3.2.3 Determinação dos ácidos gordos nos eritrócitos	43
3.2.4 Comparação dos ácidos gordos no fígado, tecido adiposo e nos eritrócitos	47
3.3 Determinação do licopeno.....	51
IV. CONCLUSÕES.....	55
V. REFERÊNCIAS	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Delineamento das dietas suplementadas com sardinha em conserva e licopeno.	27
Tabela 2 - Distribuição dos grupos/dietas.	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplo de campanhas que abordam a temática da obesidade (http://www.google.pt/images/obesidade).	14
Figura 2 - Estrutura dos principais ácidos gordos (LA, ALA, EPA, DHA e ARA).	16
Figura 3 - Metabolismo dos ácidos gordos da família ω 3 e ω 6 (adaptado de Martin <i>et al.</i> , 2006).	17
Figura 4 - Aterosclerose (www.medmovies.com).	18
Figura 5 - Colesterol HDL e LDL (http://www.medmovie.com).	20
Figura 6 - Licopeno (Rodriguez-Amaya, 2001).	26
Figura 7 - Perfil de ácidos gordos das dietas administradas aos 6 grupos. Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).	34
Figura 8 - Concentração de licopeno presente nas dietas dos 6 grupos. Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).	35
Figura 9 - Perfil de ácidos gordos do fígado ($n=9$), (A) - G1, G3 e G4; (B) - G1 e G2. Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).	37
Figura 10 - Perfil de ácidos gordos do fígado ($n=9$), (A) - G2, G3 e G5; (B) - G2, G4 e G6. Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).	39
Figura 11 - Perfil de ácidos gordos do tecido adiposo ($n=9$), (A) - G1, G3 e G4; (B) - G1 e G2. Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).	41
Figura 12 - Perfil de ácidos gordos do tecido adiposo ($n=9$), (A) - G2, G3 e G5; (B) - G2, G4 e G6. Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).	42
Figura 13 - Perfil de ácidos gordos dos eritrócitos ($n=9$), (A) - G1, G3 e G4; (B) - G1 e G2. Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).	44
Figura 14 - Perfil de ácidos gordos dos eritrócitos ($n=9$), (A) - G2, G3 e G5; (B) - G2, G4 e G6. Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).	46
Figura 15 - Perfil de ácidos gordos dos eritrócitos, do fígado e do tecido adiposo ($n=9$), (A) - G1, (B) - G3, (C) - G4, (D) - G2, (E) - G5 e (F) - G6. Diferentes letras correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$).	47

Figura 16 - Concentração de licopeno presente no fígado dos 6 grupos. Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).52

ABREVIATURAS

ALA - Ácido α -linoleico

AA - Ácido araquidónico

DHA - Ácido docosa-hexaenóico

DPA - Ácido docosapentaenóico

EPA - Ácido eicosapentaenóico

MUFA - Ácidos gordos monoinsaturados

PUFA - Ácidos gordos polinsaturados

ω 6 - Ácidos gordos ómega 6

ω 3 - Ácidos gordos ómega 3

SFA - Ácidos gordos saturados

LA - Ácido linoleico

AVC - Acidente vascular cerebral

GC - Cromatografia gasosa

HPLC - Cromatografia líquida de alta pressão

DC - Doença cardiovascular

RNS - Espécies reactivas de azoto

ROS - Espécies reactivas de oxigénio

EUA - Estados Unidos da América

FAO - Food and Agriculture Organization

G - Grupo

BHT - Hidroxitolueno butilado

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade

HDL - Lipoproteínas de elevada densidade

n - Número de amostras / indivíduos

NP - Norma Portuguesa

p - Nível de significância observada

WHO - World Health Organization

I. INTRODUÇÃO

1.1. Obesidade e Doenças Cardiovasculares

A obesidade reflecte as modificações que têm vindo a ocorrer no estilo de vida, tendo aumentado significativamente o número de pessoas com excesso ponderal e obesas; tem, por isso, sido considerada a pandemia moderna ao nível mundial. As doenças que estão associadas à obesidade são: a hipertensão, a hipercolesterolemia, a diabetes tipo 2, os problemas da coluna, a osteoartrose, a arteriosclerose, o enfarte do miocárdio e o acidente vascular cerebral (AVC) (Nettleton e Katz, 2005; Carpentier *et al.*, 2006; Shoelson *et al.*, 2006; Thorsdóttir *et al.*, 2007).

A American Heart Association (AHA) estima que a percentagem da obesidade e dos indivíduos com excesso ponderal na Europa é de aproximadamente 57,1%. A obesidade é uma doença crónica que necessita de prevenção e de tratamento prolongado, e aumenta de forma significativa as taxas de morbilidade e mortalidade causada pela doença cardiovascular (DC) (AHA, 2010).

Segundo Rodrigues *et al.* (2008), a obesidade infantil e da adolescência apresenta um elevado crescimento, nunca antes registado, e no caso específico de Portugal, os índices de obesidade juvenil encontram-se entre os mais altos a nível mundial.

O excesso ponderal reflecte situações pouco saudáveis e é um risco acrescido de doenças, como por exemplo, a diabetes, a doença coronária e vários tipos de cancro (Shoelson *et al.*, 2006; Thorsdóttir *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008). As pessoas com maus hábitos alimentares ingerem demasiados açúcares e gorduras. As gorduras e os açúcares em excesso fornecem energia adicional. Se o nível de exercício físico não for suficiente para queimar toda esta energia, a gordura ingerida é armazenada sob a forma de gordura corporal, o que se traduz em excesso de peso (Thorsdóttir *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008). A figura 1 é um dos muitos exemplos de campanhas que alertam para o problema da obesidade. De acordo com os mesmos autores, uma dieta prudente e bem estruturada, associada à actividade física regular, são sem dúvida a melhor estratégia no controlo desta doença (obesidade).

O consumo de dietas ricas em gordura e açúcares é um dos factores que levam à predisposição da obesidade, no entanto, existem outros factores como os antecedentes familiares de obesidade, a ausência de exercício físico, os maus hábitos alimentares e uma doença subjacente, como por exemplo diabetes tipo 2 (Nettleton e Katz, 2005; Rodrigues *et al.*, 2008).



Figura 1 - Exemplo de campanhas que abordam a temática da obesidade (<http://www.google.pt/images/obesidade>).

Como forma de reduzir o excesso ponderal tem-se recorrido ao uso de dietas pobres em gordura, no entanto, sabe-se que a natureza da gordura, ou seja, o tipo e do grau de saturação dos ácidos gordos presentes na dieta alimentar, é de extrema importância, assim como a quantidade que é ingerida (Rodrigues *et al.*, 2008).

Inúmeros estudos realizados nos últimos anos têm demonstrado que a suplementação de dietas ricas em ácidos gordos ómega-3 ($\omega 3$) polinsaturados (PUFA) e o consumo de peixe em quantidade adequada, aliado a uma dieta prudente e equilibrada, protegem os consumidores contra o excesso de peso corporal e contra a intolerância à glucose (resistência à insulina - diabetes) (Nettleton e Katz, 2005; Carpentier *et al.*, 2006; Shoelson *et al.*, 2006; Thorsdóttir *et al.*, 2007; Parra, *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008; Ramel *et al.*, 2009; Ramel *et al.*, 2010).

Os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) provenientes do peixe actuam e “corrigem” as anomalias da sinalização insulínica, e previnem as alterações da homeostase (regulação global integrada) dos níveis de glucose, contribuindo deste modo para a prevenção da diabetes tipo 2 e de outras alterações cardiometabólicas que estão associadas à obesidade (Nettleton e Katz, 2005; Tirosh *et al.*, 2005; Carpentier *et al.*, 2006; Shoelson *et al.*, 2006; Thorsdóttir *et al.*, 2007; Parra, *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008; Ramel *et al.*, 2009; Ramel *et al.*, 2010).

Este mecanismo de regulação é mediado pelo decréscimo dos níveis dos ácidos gordos sob a forma livre no sangue, pelo armazenamento dos ácidos gordos no tecido adiposo subcutâneo (depósito primário) e pela diminuição da acumulação dos ácidos gordos no tecido adiposo subcutâneo profundo e intra-abdominal (depósitos secundários), músculos, rins, e no fígado, o que representa o depósito dos ácidos gordos ectópicos (Nettleton e Katz, 2005; Tirosh *et al.*, 2005; Thorsdóttir *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008).

Como consequência, a produção anormal de prostaglandinas e de adipocitoquinas (polipéptidos produzidos pelas células adiposas) que possuem propriedades e actividades autócrinas, parácrinas e endócrinas, tem condições para se normalizar (Rodrigues et al., 2008). A desregulação das adipocitoquinas provoca a resistência insulínica, a obesidade abdominal, a DC crónica e diversos tipos de cancro, como consequência da síndrome metabólica (Shoelson *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2008).

A síndrome metabólica resulta da combinação de três ou mais componentes: obesidade abdominal, níveis elevados de triglicéridos plasmáticos, baixos níveis das lipoproteínas de alta densidade (HDL) associados à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) com elevado potencial aterogénico, hipertensão arterial, hiperglicemia e/ou resistência insulínica. A síndrome metabólica e a obesidade têm aumentado em paralelo, e são por esta razão, considerados como o factor preditivo da DC (Rodrigues *et al.*, 2008).

1.2. Efeitos benéficos dos ácidos gordos ω 3 e ω 6 na prevenção de doenças cardiovasculares

1.2.1. Ácidos gordos - Aspectos bioquímicos

Os ácidos gordos são constituídos por um grupo carboxilo localizado no extremo da molécula, e na extremidade oposta um grupo metilo não funcional. A síntese dos ácidos gordos ocorre no fígado, sendo, posteriormente, transferidos para os outros tecidos, onde funcionam como combustíveis nos processos metabólicos (Horton *et al.*, 1996).

A sua classificação é feita de acordo com o comprimento da cadeia carbonada, o número, a posição e a configuração das duplas ligações. Os ácidos gordos que não apresentam duplas ligações na sua estrutura molecular são designados de ácidos gordos saturados (SFA), contrariamente, os ácidos gordos que possuam duplas ligações são designados de insaturados. Os ácidos gordos insaturados podem ser monoinsaturados (MUFA), quando possuem apenas uma dupla ligação, ou polinsaturados (PUFA) quando possuem duas ou mais duplas ligações (Campos, 1998). Segundo Huss (1995), os ácidos gordos também podem ser classificados como não essenciais, ou seja, são utilizados apenas para fins energéticos, e essenciais quando o nosso organismo não possui a capacidade de os sintetizar, sendo por este motivo necessária a sua ingestão e incorporação na dieta humana. De acordo com o mesmo autor, os ácidos gordos

essenciais com maior importância pertencem à família dos $\omega 3$ e $\omega 6$, e são os ácidos linoleico (LA - 18:2 $\omega 6$) (Figura 2 (A)) e α -linolénico (ALA - 18:3 $\omega 3$) (Figura 2 (B)).

Os produtos resultantes da actividade da pesca são muito ricos em ácidos gordos, dos quais se destacam o mirístico (14:0), o palmítico (16:0) e o esteárico (18:0) por serem os SFA mais comuns na composição do perfil de ácidos gordos dos produtos da pesca, no entanto, o ácido palmítico encontra-se em percentagens muito elevadas comparativamente com os restantes SFA. Em relação aos MUFA, o ácido oleico (18:1 $\omega 9$) é o que se encontra em maior quantidade no perfil de ácidos gordos dos produtos da pesca. Os PUFA também podem ser encontrados nestes produtos em elevadas quantidades, dos quais se destacam pela sua importância o ácido eicosapentanoico (EPA - 20:5 $\omega 3$) (Figura 2 (C)) e o ácido docosa-hexanoico (DHA - 22:6 $\omega 3$) (Figura 2 (D)), ambos $\omega 3$, e o ácido araquidónico (ARA) (Figura 2 (E)), da série $\omega 6$, representando na maior parte dos casos aproximadamente 90% do total dos PUFA, e em menor quantidade o ácido linoleico (LA) e α -linolénico (ALA) (Engler *et al.*, 2005).

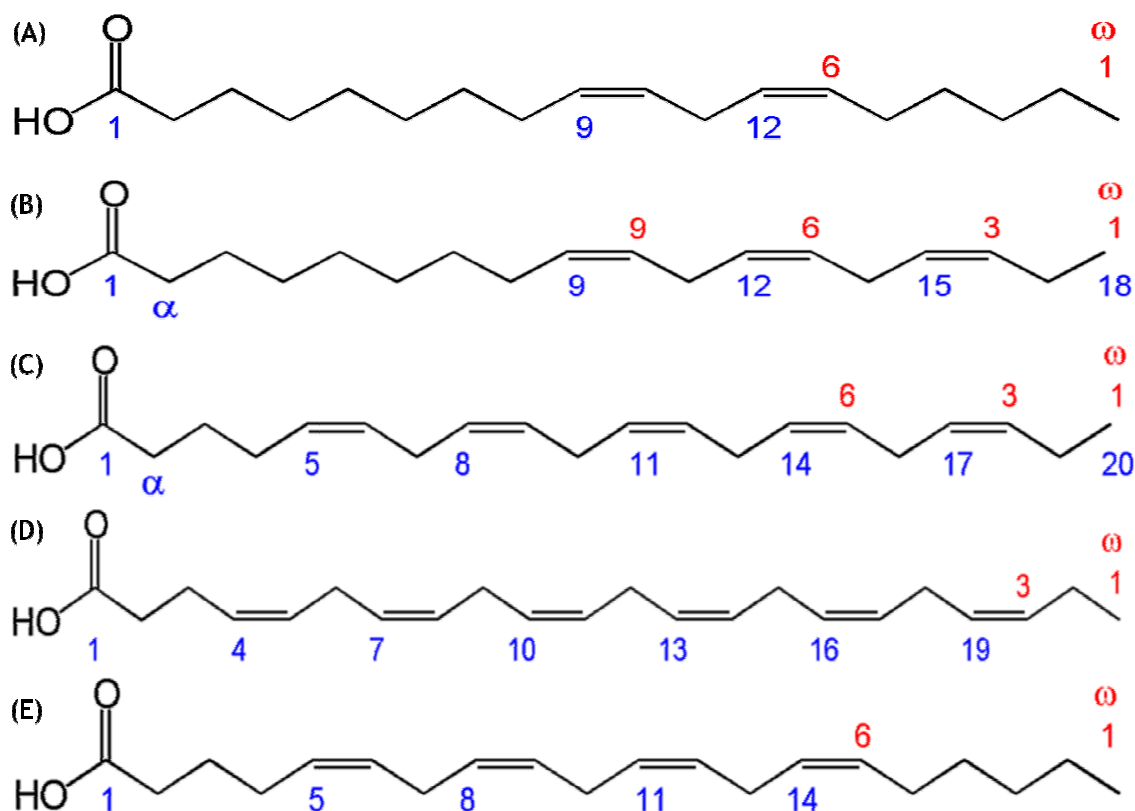


Figura 2 - Estrutura dos principais ácidos gordos (LA, ALA, EPA, DHA e ARA).

(A) - Ácido linoleico (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:LANumbering.png>);

(B) - Ácido α -linolénico (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:ALANumbering.png>);

(C) - Ácido ecosapentanoico (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:EPANumbering.png>);

(D) - Ácido docosa-hexanoico (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:DHANumbering.png>);

(E) - Ácido araquidónico (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:AANumbering.png>).

1.2.2. Ácidos gordos $\omega 3$ e $\omega 6$

1.2.2.1. Metabolismo

Segundo DeFilippis *et al.* (2006) e Martin *et al.* (2006), os PUFA podem ser da família $\omega 3$ e $\omega 6$, e são classificados deste modo devido à posição da primeira ligação dupla no terceiro e no sexto carbono, respectivamente, a partir do terminal metilo. Os ácidos gordos do tipo $\omega 3$ e $\omega 6$ podem ser obtidos directamente da alimentação ou sintetizados pelo organismo a partir do LA e do ALA, através da acção de enzimas do tipo elongases e desaturases. As elongases como o próprio nome indica, actuam através da adição de dois átomos de carbono no início da cadeia, e as desaturases oxidam dois carbonos da cadeia resultando na formação duma dupla ligação de configuração *cis* (Covington, 2004). A família $\omega 3$ obtém-se através da síntese do ALA e a família $\omega 6$ através da síntese do LA (Figura 3), a partir dos quais são sintetizados os ácidos araquidónico (AA), eicosapentaenóico (EPA) e docosa-hexaneóico (DHA) (Souza *et al.*, 2007).

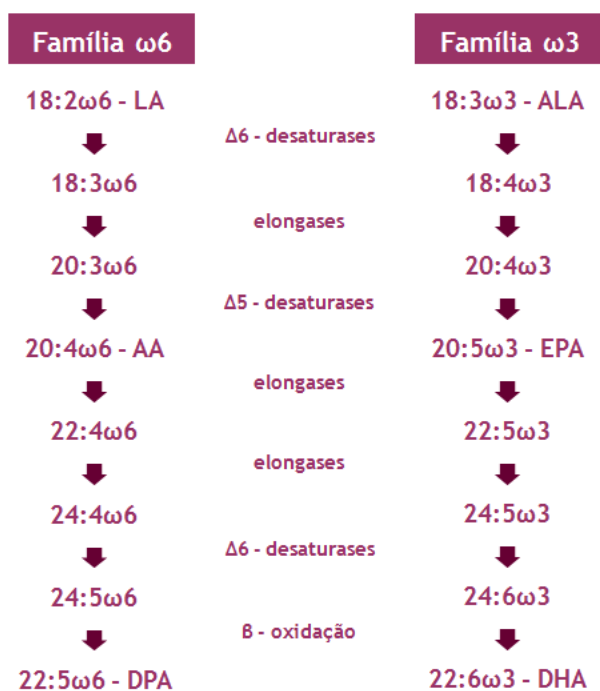


Figura 3 - Metabolismo dos ácidos gordos da família $\omega 3$ e $\omega 6$ (adaptado de Martin *et al.*, 2006).

O ALA é responsável pela produção de EPA e DHA, que são precursores de um grupo de compostos eicosanóides do qual fazem parte prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina, lipoxinas e leucotrienos (Rodrigues e Morais, 2008).

De acordo com os mesmos autores, as gorduras e as proteínas do pescado estão relacionados com os efeitos benéficos na prevenção de diversas doenças, particularmente na DC, devido à modificação de factores de risco originados pelos múltiplos mecanismos. As inflamações metabólicas de baixa densidade não são “detectadas” pelos doentes e desempenham um papel muito importante no aparecimento das referidas doenças, uma vez que dão origem ao aparecimento e agravamento da aterosclerose (Engler *et al.*, 2005; Nettleton e Katz, 2005; Breslow, 2006; Carpentier *et al.*, 2006; Shoelson *et al.*, 2006; Thorsdóttir *et al.*, 2007; Parra, *et al.*, 2008; Rodrigues e Morais, 2008; Ramel *et al.*, 2009; Ramel *et al.*, 2010).

A aterosclerose é um processo que origina lesões ao nível do sistema vascular, e é caracterizado pela infiltração das células fagocitárias e do depósito do colesterol sob a forma esterificada nos seus diferentes graus de oxidação (Figura 4). Este processo pode ser precoce, como por exemplo na adolescência, sem que seja detectado e despistado. O colesterol sob a forma esterificada provém das lipoproteínas modificadas, ou seja, que sofrem alterações provocadas pelas células fagocíticas (fagocitose) originando as “foam cells” (células espumosas). No desenvolvimento e conseqüente agravamento deste processo (ateromatoso), as placas aumentam de extensão e originam o crescimento da espessura fibro-muscular das paredes das artérias (Figura 4) (Rodrigues e Morais, 2008).



À medida que as placas crescem para o interior das artérias a circulação sanguínea é afectada, e através da instabilidade das placas ocorre a formação dum trombo na

superfície da lesão aterogénica, dando origem a isquémia (angina do peito) ou ao enfarte do miocárdio (Rodrigues e Morais, 2008).

O colesterol é uma substância lipídica sintetizada no fígado. É indispensável no organismo ao nível da preservação das membranas celulares, para a produção de hormonas, vitamina D e ácidos biliares que facilitam a digestão das gorduras (http://www.ehealthmd.com/library/lowercholesterol/LC_what.html).

Existe, por vezes, uma sobre-produção de colesterol no organismo, o que provoca a sua entrada na circulação sanguínea. O colesterol é uma substância insolúvel no sangue sendo o seu transporte mediado pelas lipoproteínas que podem ser LDL ou HDL. Quando as LDL estão em excesso no sangue, o colesterol pode acumular-se, lentamente, nas paredes das artérias que irrigam o coração e o cérebro, tornando-as mais estreitas e menos flexíveis, como já foi descrito anteriormente. Por outro lado, as HDL protegem as artérias porque actuam ao nível da eliminação das LDL, diminuindo deste modo o risco de DC (Breslow, 2006; Rodrigues e Morais, 2008; Ramel *et al.*, 2009; http://www.ehealthmd.com/library/lowercholesterol/LC_what.html).

O organismo necessita do colesterol que é transportado pelas LDL para que o metabolismo ocorra normalmente, uma vez que o colesterol é extremamente importante para inúmeras biofunções, tais como a hormonogénese e “*turnover*” das biomembranas. O HDL actua ao nível da remoção do colesterol total que é depositado em excesso nos tecidos extra-hepáticos. Quando os valores de colesterol LDL estão associados a níveis baixos de HDL verifica-se um dos factores de risco para a DC. Por outro lado, níveis elevados de triglicéridos aumentam também a predisposição para as doenças cardiovasculares, uma vez que dão origem a LDL de dimensões menores e maior densidade, estando estas mais susceptíveis de oxidarem, assim como, as HDL perdem a sua funcionalidade na remoção do colesterol tecidual (Figura 5) (Rodrigues *et al.*, 2008; Ramel *et al.*, 2009).

As LDL que circulam ou as que se acumulam na estrutura da parede vascular podem sofrer, por sua vez, reacções de oxidação provocadas por espécies reactivas, sobretudo envolvidas nos mecanismos de defesa ou como “*by-products*” dos processos metabólicos que utilizam o oxigénio. As LDL oxidadas actuam no processo aterogénico acelerado da parede vascular disfuncional (Rodrigues *et al.*, 2008; Ramel *et al.*, 2009).

No entanto, o aparecimento das LDL oxidadas pode ter influência no tipo de gorduras que são ingeridas, podendo esta acção ser minimizada com o consumo simultâneo de alimentos ou através da incorporação de ingredientes com propriedades antioxidantes.

Na Europa apontam-se para valores médios de colesterol total no sangue inferiores a 190 mg/dl, no entanto, na população em geral, a tendência será para valores superiores aos recomendáveis pela Direcção Geral de Saúde (www.dg-saude.pt).

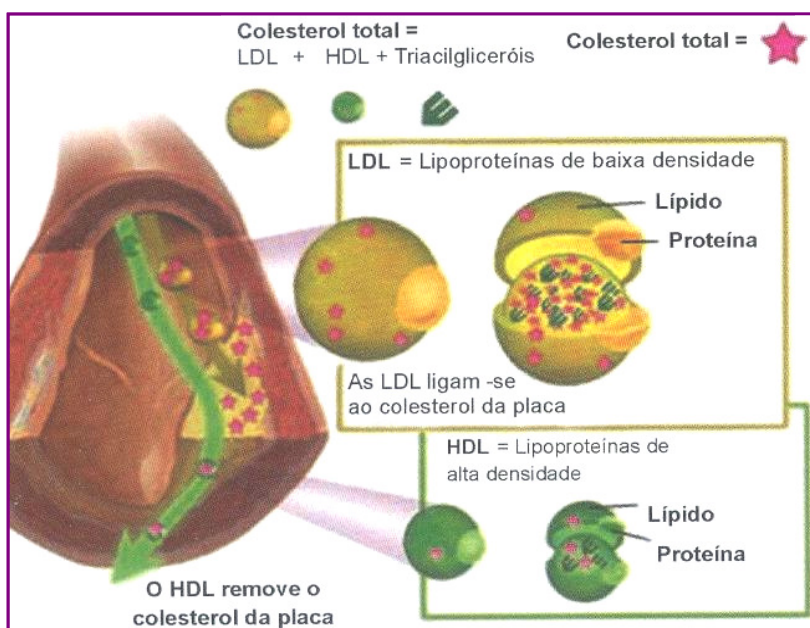


Figura 5 - Coolesterol HDL e LDL (<http://www.medmovie.com>).

Segundo Fehily *et al.* (1994) os MUFA e os PUFA do tipo ω_6 presentes na gordura do peixe têm propriedades ao nível da prevenção destas doenças, uma vez que contribuem para a redução dos níveis de colesterol total. Os PUFA do tipo ω_3 , como o EPA e o DHA possuem propriedades anti-aterogénicas e anti-trombóticas (Rodrigues e Morais, 2008), assim como modulam o metabolismo das prostaglandinas possuindo, então, propriedades anti-inflamatórias (DeFilippis, 2006; Martin *et al.*, 2006) e proporcionando desse modo benefícios significativos para a saúde e bem-estar (Rodrigues e Morais, 2008).

O aumento do consumo dos produtos da pesca ou dos produtos suplementados com ácidos gordos ω_3 (EPA e DHA) tem sido indicado na protecção contra as doenças do foro cardiovascular e na morte prematura. Os ácidos gordos ω_3 são os mediadores que actuam ao nível da activação dos factores de transcrição que estão relacionados com a expressão dos genes envolvidos na oxidação e na síntese dos lípidos. O efeito resulta da redução dos níveis dos triglicéridos plasmáticos e da alteração das LDL aterogénicas, também denominadas de LDL tipo B. Para além destes efeitos, os ácidos gordos ω_3 contribuem para a diminuição da carga excessiva produzida pela síndrome metabólica, assim como, a modulação da inflamação, da normalização da actividade plaquetária, da função endotelial e da tensão arterial (Rodrigues *et al.*, 2008).

De acordo com Rodrigues *et al.* (2008), inúmeros estudos desde os anos 70 do século passado evidenciam que o consumo do pescado influencia directamente o estado de saúde, e mostraram que existe uma relação entre o consumo destes produtos e a protecção contra as DC e morte precoce. Esses estudos demonstraram ainda que existe uma diminuição na incidência da morte prematura com origem no enfarte do miocárdio que estava intimamente relacionado com o aumento do consumo de peixe. Dado que os consumidores de peixe apresentavam taxas de sobrevivência superiores à dos não consumidores, registando este grupo (não consumidores de peixe) as taxas mais elevadas de doenças cardiovasculares. Os estudos indicaram ainda que para consumos semanais de uma ou mais refeições à base de peixe os níveis de risco da DC diminuem significativamente (Wang *et al.*, 2006; Parra *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008a; Ramel *et al.*, 2009; Ramel *et al.*, 2010).

Estudos mais recentes, desde a década de 90, confirmaram que o aumento do colesterol dietético é provocado pelos elevados níveis de colesterol presente no sangue, e como consequência o risco das doenças cardiovasculares também aumenta. Este factor é de extrema importância, uma vez que o colesterol ingerido na dieta está associado ao consumo de SFA. Existem factores que podem influenciar a forma como o corpo irá interagir com o colesterol dietético, tais como a idade, o sexo, a distribuição da adiposidade corporal, e o mais importante a composição da dieta em ácidos gordos. Existem duas classes de ácidos gordos dietéticos que podem aumentar os níveis de colesterol plasmático, os SFA de origem animal e os ácidos gordos sob a forma *trans* que são produzidos no processo de hidrogenação dos óleos vegetais (Engler *et al.*, 2005; Mooradian *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2008).

A estratégia geral para a diminuição do colesterol consiste em limitar a ingestão de produtos ricos em colesterol e na redução de gorduras, especialmente as SFA de origem animal. O ácido oleico presente no azeite virgem e extra virgem faz parte das gorduras a serem incorporadas na elaboração duma dieta prudente (Mooradian *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2008). O consumo de pescado previne as doenças cardiovasculares, uma vez que resulta da combinação de vários mecanismos tais como, redução dos triglicéridos plasmáticos, redução da pressão arterial, melhoria da perfusão sanguínea, melhoria das arritmias cardíacas, diminuição da inflamação e melhoria de reactividade vascular (Breslow, 2006; Thorsdóttir *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008). A *American Heart Association* recomenda à população em geral a ingestão de duas ou mais refeições de peixe, rico em PUFA (ω 3), nos regimes alimentares e, aos portadores das doenças coronárias, um consumo diário igual ou superior a 1 g de EPA e DHA (Rodrigues *et al.*, 2008).

O EPA e o DHA estão associados à diminuição de casos com diagnóstico cancerígeno ao nível do intestino, uma vez que evitam a formação de metabolitos inflamatórios no tubo digestivo (Rodrigues *et al.*, 2008). Ainda, de acordo com os mesmos autores, estes ácidos têm evidenciado uma capacidade de inibição da proliferação das células cancerosas da mama e da próstata.

O DHA é extremamente importante para o sistema nervoso, em particular para os neurónios e foto-receptores da retina, uma vez que este é rico em ácidos gordos ω -3. Influencia as propriedades físicas das membranas cerebrais e as características dos seus receptores, as interacções celulares e a actividade enzimática (Sena, 2008).

Segundo Xavier (2008), os ácidos gordos ω 3 têm um papel crítico no desenvolvimento e no funcionamento do sistema nervoso central, ou seja, a deficiência destes compostos pode contribuir para o aparecimento de algumas doenças do foro neurológico e psiquiátrico. Por outro lado, no processo do envelhecimento os níveis de DHA no cérebro diminuem, provocando um aumento da percentagem de colesterol, facto que se observa e constata em doentes de Alzheimer, Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (Martin *et al.*, 2006). Os mecanismos responsáveis pelo funcionamento adequado podem sofrer perturbações ao nível da neurotransmissão, nos factores de protecção contra o *stress* oxidativo e ainda na constituição e no funcionamento das membranas dos neurónios (Xavier, 2008). Além do DHA presente na constituição das células do sistema nervoso, também se encontram fosfolípidos, mas em quantidades inferiores comparativamente com o DHA. Os fosfolípidos que estão associados aos neurónios são bastante ricos em ácido araquidónico (AA), o que sugere o seu envolvimento na transmissão sináptica. O AA está relacionado com o desenvolvimento do cérebro e da retina durante o período de gestação e nos primeiros anos de vida, pelo que a sua presença é indispensável desde a formação do indivíduo (Al *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 2006).

O AA é um ácido gordo essencial da família ω 6 que está armazenado nas membranas celulares, e é responsável por transmitir a informação das alterações adaptativas em resposta aos estímulos musculares. É o principal componente para a síntese de prostaglandinas PGE2 que estão directamente relacionadas com a síntese proteica e com a hipertrofia muscular após o exercício. O AA está directamente relacionado com a regeneração e o aumento do músculo, melhora a recepção dos níveis hormonais de androgénio e insulina, e aumenta a formação de óxido nítrico. Além destes benefícios, a longo prazo, actua ao nível da regeneração dos vasos sanguíneos no tecido muscular (Al *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 2006; Surette, 2008).

Além da importância na prevenção de várias doenças, anteriormente mencionadas, tem vindo a ser demonstrado que o consumo de alimentos com doses recomendáveis de

PUFA, nomeadamente de DHA e AA, é indispensável durante a gravidez e na fase de aleitamento uma vez que estes ácidos gordos são responsáveis pelo bom desenvolvimento do sistema nervoso e do tecido conjuntivo nos fetos (Al *et al.*, 1995).

1.2.3. Relação dos ácidos gordos $\omega 3$ e $\omega 6$

Os $\omega 6$ são os ácidos gordos que estão presentes na maioria dos alimentos, fazem por este motivo parte de todas as dietas, particularmente das ocidentais (Simopoulos, 2002). No entanto, devido à competição entre as enzimas desaturases e elongases, o consumo excessivo de $\omega 6$ resulta na diminuição da síntese de ácidos gordos $\omega 3$, tais como o EPA e o DHA (Martin *et al.*, 2006). Por este motivo, alguns autores sugerem que os ácidos gordos $\omega 6$ possuem características pró-inflamatórias, uma vez que o seu consumo excessivo dá origem a efeitos como a proliferação do músculo liso podendo chegar ao ferimento oxidativo do endotélio, a alterações ao nível das mitocôndrias e à activação de factores transcricionais na vascularização (Ghosh *et al.*, 2006). Embora as desaturases e elongases possuam uma maior afinidade para os $\omega 3$, durante os processos de desaturação e alongamento da cadeia, os ácidos gordos $\omega 3$ e $\omega 6$ competem pelas enzimas envolvidas nestas reacções, pelo que a conversão de ALA em ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa está dependente dos níveis de LA na dieta (Martin *et al.*, 2006). Assim, uma ingestão desequilibrada e elevada de LA inibe a capacidade natural do organismo sintetizar o DHA (Soccol *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2006).

Segundo Simopoulos (2008), após o processo de industrialização, o consumo de óleos refinados com altos teores de LA aumentou e conseqüentemente a ingestão de fruta e legumes diminuiu, o que resultou em dietas com baixos níveis de ácidos gordos $\omega 3$. Esta tendência tem-se agravado e o panorama a nível mundial tem piorado consideravelmente, tendo-se constatado que a ingestão média de ácidos gordos presentes nas dietas ocidentais proporciona relações $\omega 3/\omega 6$ compreendidas entre 1/10 e 1/20, valores estes, bastante inferiores aos estimados antes da revolução industrial, cuja relação $\omega 3/\omega 6$ estava compreendida entre 1/1 e 2/1. Simopoulos (2008) refere ainda que nos EUA se verificou que o número de doentes de cancro e de doenças cardiovasculares era três vezes superior ao registado nos países mediterrânicos. A menor incidência destas doenças em países como a Grécia está associada ao facto das dietas mediterrânicas serem, geralmente, caracterizadas pelo consumo equilibrado de fruta e legumes ricos em ALA e de peixe rico em EPA e DHA. No entanto, alguns estudos clínicos sugerem que o aumento da taxa de mortalidade nas sociedades industrializadas

está relacionado com os maus hábitos alimentares das populações e a falta de exercício físico (Martin *et al.*, 2006; Simopoulos, 2008).

Dada a competição que envolve os $\omega 3$ e $\omega 6$, torna-se importante, em termos nutricionais, conhecer a relação entre estes ácidos gordos presente nos alimentos ingeridos diariamente. Neste sentido, têm sido elaborados vários pareceres, quer por investigadores quer por organismos internacionais de saúde, com o intuito de estabelecer valores recomendáveis no que diz respeito às razões entre os $\omega 3$ e os $\omega 6$. A WHO e a FAO recomendam dietas cuja razão $\omega 3/\omega 6$ esteja compreendida entre 1/5 a 1/4 (Martin *et al.*, 2006). No entanto, valores de razão $\omega 3/\omega 6$ entre 1/3 e 1/2 têm sido, também, sugeridas pois podem possibilitar uma maior conversão do ácido ALA em DHA. Simopoulos (2008) refere que, no caso dos indivíduos com as patologias anteriormente mencionadas, a razão $\omega 3/\omega 6$ adequada ao organismo varia consoante o tipo de patologia e o seu estado de evolução.

1.3. Efeitos benéficos do licopeno na prevenção de doenças cardiovasculares

Os carotenóides são pigmentos que ao longo dos últimos anos têm vindo a ser amplamente estudados devido às suas propriedades antioxidantes (Ferreira *et al.*, 2009). São sintetizados pelas plantas e pelos microrganismos; contrariamente, os animais não possuem essa capacidade. As principais fontes de carotenóides na dieta humana são a fruta e os vegetais (Shi, 2000; Giovannucci, 2002; Willis e Wians, 2003). Exemplos de carotenóides incluem o β -caroteno, o α -caroteno, o licopeno, a luteína e o β -criptoxantina (Rao e Agarwal, 1999; Khachik *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2009).

Segundo Erdman *et al.* (2009), é essencial para o metabolismo e para a saúde a manutenção do equilíbrio dos agentes oxidantes e dos agentes antioxidantes no meio intracelular e extracelular. A obtenção de energia é conseguida através do metabolismo dos macronutrientes presentes na dieta, no entanto, neste processo ocorre a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e espécies reactivas de azoto (RNS) que podem danificar os lípidos, as proteínas e o DNA (Erdman *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2009). Em condições normais, existem mecanismos que neutralizam o excesso da formação de ROS ou RNS que nos permitem proteger contra os desequilíbrios originados nos processos de oxidação e/ou no *stress* oxidativo (Erdman *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2009). Segundo Sies (2007), os animais possuem enzimas que actuam como antioxidantes sendo a principal defesa contra o *stress* oxidativo. Estas enzimas interceptam as ROS e RNS, e reparam os danos provocados pelo *stress* oxidativo nas macromoléculas, como o DNA.

Pequenas moléculas, como os carotenóides, as vitaminas (vitamina E e C) e alguns minerais (selénio e manganês) funcionam como antioxidantes podendo por vezes interagir com enzimas como por exemplo a glutathione peroxidase e a superóxido dismutase, intervindo desse modo na intercepção ou extinção das ROS e RNS (Young *et al.*, 2004; Bose e Agrawal, 2007).

Os carotenóides podem funcionar como antioxidantes, através do impedimento ou da supressão do oxigénio simples ou dos radicais peróxidos. Esta supressão envolve transferência de energia entre as moléculas que pode ser dissipada para o meio aquoso sob a forma de calor ou destruir as moléculas dos carotenóides. Para os carotenóides funcionarem como antioxidantes eficazes, devem estar presentes em concentrações adequadas e no local específico onde ROS ou RNS se formam (Agarwal e Rao, 2000; Erdman *et al.*, 2009).

Alguns investigadores defendem que muitas doenças crónicas, tais como doenças cardiovasculares, cancro e diabetes, e o próprio processo de envelhecimento estão relacionados com o *stress* oxidativo (Rao e Agarwal, 1999; Takeoka *et al.*, 2001 *in* Omoni e Aluko, 2005; Erdman *et al.*, 2009).

Na última década tem havido um consenso universal em relação ao consumo de alimentos ricos em carotenóides (alguns frutos e vegetais) e na relação directa com a diminuição do risco das doenças crónicas, nomeadamente doenças cardiovasculares e cancro (Rao e Agarwal, 1999; Khachik *et al.*, 2002; Erdman *et al.*, 2009).

De acordo com Campos (1998), os carotenóides pertencem à classe dos lípidos poli-isoprénicos, e possuem na sua estrutura 40 átomos de carbono de cadeia longa de duplas ligações conjugadas formando a parte central da molécula e de simetria bilateral em torno da ligação dupla central (Boileau *et al.*, 1999; Rao e Agarwal, 2000; Shi, 2000). Estas características são comuns e são responsáveis pela sua reactividade química e pela propriedade de absorção da luz (Ferreira *et al.*, 2009), no entanto, no presente trabalho, apenas o licopeno foi alvo de investigação.

O licopeno é um carotenóide de coloração avermelhada de estrutura acíclica, também designado de tetraterpeno (C₄₀) (Figura 6), com um peso molecular de 536,87 g/mol e fórmula molecular C₄₀H₅₆, sendo constituído por 89,45% de carbono e 10,51% de hidrogénio; contém onze ligações duplas conjugadas e uma dupla ligação em cada extremidade da cadeia (Rodríguez-Amaya, 2001). Alguns autores referem que o licopeno é o β-caroteno na forma acíclica sem a actividade de pró-vitamina A (Nguyen e Schwartz, 1999 *in* Bose e Agrawal, 2007), no entanto Agarwal e Rao (2000) defendem que o licopeno apresenta maior actividade antioxidante do que o β-caroteno, α-caroteno e α-tocoferol.

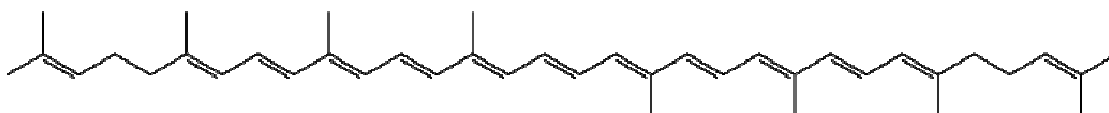


Figura 6 - Licopeno (Rodriguez-Amaya, 2001).

O licopeno presente nos alimentos, principalmente no tomate ou nos produtos alimentares em este que seja incorporado, em concentrações adequadas no sangue, está associado à diminuição das doenças cardiovasculares e do risco do cancro da próstata (Sharoni *et al.*, 2000; Dewanto, *et al.*, 2002; Khachik *et al.*, 2002; Canene-Adams *et al.*, 2005; Voutilainen *et al.*, 2006). Segundo Erdman *et al.*, (2009), dos carotenóides testados *in vitro*, o licopeno tem demonstrado ser o que apresenta maior poder antioxidante e é responsável pela prevenção das doenças acima descritas. Estudos realizados demonstraram que concentrações elevadas de licopeno no tecido adiposo foram associadas à diminuição do risco do enfarte do miocárdio. Embora nem todos os estudos epidemiológicos sejam concordantes, a maioria defende uma relação inversa entre a ingestão e as concentrações de licopeno presentes nos tecidos e as doenças cardiovasculares (Rao e Agarwal, 1999; Petr e Erdman, 2005; Takeoka *et al.*, 2001 in Omoni e Aluko, 2005;).

1.4. Objectivos

O presente trabalho está inserido no projecto de investigação “PTDC/70560/2006 - Projecto Ómega 3” em que se pretendem avaliar o efeito da ingestão regular de diferentes níveis de sardinha e de tomate em pó, e da sua interacção na concentração dos ácidos gordos e do licopeno no fígado, eritrócitos e tecido adiposo, assim como os mecanismos que estão associados aos processos metabólicos, endócrinos e genéticos, com o objectivo de clarificar a importância dos PUFA $\omega 3$ e dos antioxidantes para a saúde e bem-estar.

Os principais objectivos deste trabalho foram:

- a) Avaliar o efeito da suplementação e ingestão regular de diferentes doses de sardinha em conserva no perfil dos ácidos gordos do fígado, eritrócitos e tecido adiposo de ratos Wistar;
- b) Avaliar o efeito que o licopeno exerce sobre os ácidos gordos;
- c) Avaliar o efeito dos ácidos gordos na incorporação do licopeno no fígado.

II. MATERIAL e MÉTODOS

2.1. Produtos químicos

Os solventes *n*-hexano 99,0%, acetato de etilo 99,8%, acetonitrilo 99,9%, metanol 99,9%, eram de grau HPLC e marca Lab-Scan (Lisboa, Portugal), o cloreto de acetilo 98% da Merck (Darmstadt, Alemanha). O Licopeno e os padrões dos ésteres metílicos de ácidos gordos, assim como o padrão interno, foram obtidos na Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO EUA). O ácido ascórbico e o hidroxitolueno butilado (BHT) foram adquiridos na Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha).

2.2. Delineamento experimental das dietas

Foram delineadas 6 dietas com base no estudo de Optilip (EN 472) com diferentes composições para serem administradas a 9 ratos Wistar (machos) por cada grupo, sendo que a dieta 1, foi designada de dieta ou/grupo controlo, a dieta/grupo 2, designada de controlo e suplementada com licopeno, a dieta/grupo 3 foi suplementada com 25% de sardinha em conserva, a dieta/grupo 4 foi suplementada com 50% de sardinha em conserva e a dieta/grupo 5 e 6, a conjugação das dietas 2 e 3 e das dietas 2 e 4, respectivamente (Tabela 1). Os ratos foram alimentados diariamente durante 10 semanas (*ad libidum*), tendo sido realizadas colheitas de sangue aos 0, 3, 6 e 10 semanas.

Tabela 1 - Delineamento das dietas suplementadas com sardinha em conserva e licopeno.

Percentagem (%)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Caseína	20,00	18,80	12,60	5,25	11,40	4,05
Amido de milho	37,85	24,00	38,70	39,50	24,80	25,60
Maltodextrina	13,20	13,20	13,20	13,20	13,20	13,20
Sacarose	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Celulose	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Óleo de soja	8,90	8,95	4,45	0,00	4,55	0,10
L-Cisteína	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Mistura de mineraxs	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Mistura de vitaminas	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
TBHQ (antioxidante)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Sardinha em conserva	0,00	0,00	11,00	22,00	11,00	22,00
Tomate em pó	0,00	15,00	0,00	0,00	15,00	15,00
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

2.3. Avaliação dos ácidos gordos e do licopeno das dietas

2.3.1. Determinação do perfil de ácidos gordos

O perfil de ácidos gordos das dietas dos ratos wistar foi determinado em duplicado, e de acordo com o método desenvolvido por Lepage e Roy (1986) e modificado por Cohen *et al.* (1988), por cromatografia de fase gasosa. O princípio deste método consiste numa trans-esterificação dos ácidos gordos dos triacilgliceróis presentes na amostra convertendo-os em ésteres metílicos, e utiliza o metanol para remover o glicerol. Inicialmente, pesaram-se aproximadamente 300 mg para tubos de ensaio devidamente identificados com a capacidade de 18 ml. Adicionou-se a cada tubo, 5 ml da solução de cloreto de acetilo e metanol preparada diariamente na proporção de 1:19 (v/v), respectivamente. De modo a controlar o processo de extracção e de identificação, foi adicionado a cada tubo 50 µl de padrão interno C21:0 (10 mg/ml), seguido de homogeneização no vórtex. As amostras foram incubadas a 80 °C num banho com agitação de 200 rpm durante 1 h e arrefecidas à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se a cada tubo 1 ml de água Milli-Q e 2 ml de *n*-hexano e agitou-se no vórtex. Fez-se uma centrifugação durante 5 min a 2000 g e recolheu-se a fase orgânica (superior) de cada tubo, a qual foi filtrada recorrendo ao uso de uma microcoluna de algodão e sulfato de sódio anidro a fim de eliminar a água, e transferida para um *vial* com capacidade de 2 ml. O perfil de ácidos gordos foi obtido num GC modelo VARIAN CP 3800 equipado com um injector *split/splitless*, detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar de sílica fundida revestida com um filme de polietilenoglicol DB-wax o (Agilent J&W Scientific, EUA) (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura). O programa de temperatura do forno foi o seguinte: temperatura inicial da coluna de 180 °C, durante 5 min; de seguida a temperatura foi aumentando gradualmente 4 °C/min até 220 °C a qual permaneceu durante 25 min. No final de cada análise a coluna foi aquecida a 240 °C durante 15 min (programa de limpeza) O gás de transporte (hélio) tinha um caudal de 1,0 ml/min, medido a 180 °C. A injeção *split* (1:100) foi realizada a 180 °C. Para cada análise injectou-se 2 µl de amostra. A identificação dos ácidos gordos foi feita com base na comparação entre os tempos de retenção de cada ácido gordo presente na amostra e os tempos de retenção de padrões previamente identificados, usando o software CSW 1.7 (DataApex 1.7).

2.3.2. Determinação do licopeno

Nas dietas dos ratos wistar o licopeno foi determinado de acordo com o método desenvolvido por Prates *et al.* (2006) com algumas modificações. Este método consiste num processo de saponificação seguido da extracção. Pesaram-se aproximadamente 85 mg de ração liofilizada e colocou-se nos tubos devidamente identificados, adicionando de seguida aproximadamente a cada tubo 20 mg de ácido ascórbico e 25 mg de BHT. A solução de saponificação foi preparada diariamente com hidróxido de potássio a 11% (m/v) numa mistura de 55% (v/v) em etanol absoluto e 45% em água Milli-Q, e adicionou-se a cada tubo 5,5 ml da solução resultante. Agitou-se no vórtex de modo a homogeneizar as amostras. O gás formado durante esta fase do processo foi eliminado sob uma corrente de azoto. Para ocorrer a saponificação, as amostras foram incubadas num banho com a agitação de 200 rpm a 80 °C durante 15 min e arrefecidas num banho a 5 °C durante 1 min. Após o arrefecimento, adicionou-se 1 ml de água Milli-Q e 3 ml de *n*-hexano, agitou-se no vórtex e centrifugou-se durante 5 min a 2000 g. O sobrenadante foi cuidadosamente extraído e desidratado em microcolunas com sulfato de sódio anidro e colocadas em novos tubos de ensaio devidamente identificados, seguido de evaporação sob corrente de azoto. O licopeno de cada amostra foi extraído e solubilizado em 1 ml de *n*-hexano e posteriormente filtrado com filtros descartáveis PTFE de 0,2 µm (Acrodisc® CR 25 mm Syring Filter, Pall life Sciences), transferido para *vial* de cor âmbar e analisado no HPLC. A separação e análise dos carotenóides foi realizada por um sistema de HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, EUA), equipado com uma bomba quaternária G1311A Agilent, um desgaseificador G1379A Agilent, um amostrador automático G1329A Agilent, uma coluna termostaticada G1316A Agilent e um detector UV-Vis G1314A Agilent. O sistema de cromatografia foi controlado e os cromatogramas processados por um computador HP ChemStation e por um software LC 3D (Rev. A.09.01, Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, EUA). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna Phenomenex Gemini C18 de fase reversa (5 µm, 250 x 4,6 mm ID, 5 µm tamanho de partícula), operando a pressão constante e a 20 °C. A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrilo e acetato de etilo na proporção de 93:7 (v/v) com um caudal de 1 ml/min, tendo cada determinação a duração de 45 min. O volume de injeção foi 30 µL. A quantificação foi baseada na resposta do sinal de absorvância (comprimento de onda a 450 nm), e foi traçada uma recta de calibração com uma solução padrão de licopeno e os resultados expressos em µg por g de base seca.

2.4. Avaliação dos ácidos gordos e do licopeno no fígado, tecido adiposo e nos eritrócitos

2.4.1. Selecção, colheita e preparação do fígado, tecido adiposo e dos eritrócitos após o abate

Nove dos 54 ratos correspondem ao grupo controlo e os outros 45 foram distribuídos de forma aleatória em 5 grupos (9 ratos por grupo/dieta) de acordo com a tabela 2. Fez-se a extracção do sangue para os tubos devidamente catalogados (Tabela 2) e os eritrócitos foram armazenados em azoto líquido a - 80 °C. Após o abate dos ratos, procedeu-se à pesagem e separação dos órgãos para papel de alumínio devidamente identificados e armazenados a - 80 °C. Posteriormente, o fígado dos 54 indivíduos e o tecido adiposo foram liofilizados e armazenados a - 80 °C antes de cada processo de extracção.

Tabela 2 - Distribuição dos grupos/dietas.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
02	03	01	08	09	05
14	07	04	12	22	06
17	10	26	18	24	11
20	15	30	19	29	13
21	16	35	23	33	28
25	27	39	31	40	36
32	37	45	34	50	38
41	48	53	44	51	42
47	54	55	52	56	43

2.4.2. Determinação dos ácidos gordos

O perfil de ácidos gordos dos eritrócitos, do fígado e do tecido adiposo, dos 54 ratos Wistar foi determinado de acordo com o método desenvolvido por Lepage e Roy (1986) e modificado por Cohen *et al.* (1988) por cromatografia de fase gasosa, e descrito anteriormente no ponto 2.3.1. As alterações ocorreram nas massas utilizadas, tendo sido pesados aproximadamente 300 mg de eritrócitos, 75 mg de fígado e 100 mg de tecido adiposo, ambos liofilizados. Os resultados de cada dieta são a média das 9 réplicas (indivíduos) e foram processados e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo e a área do padrão interno foi eliminada.

2.4.3. Determinação do licopeno

O licopeno do fígado e do tecido adiposo dos 54 ratos Wistar foi determinado de acordo com o método desenvolvido por Prates *et al.* (2006) e descrito anteriormente no ponto 2.3.2.. As alterações ocorreram nas massas utilizadas, tendo sido pesados aproximadamente 75 mg de fígado e 100 mg de tecido adiposo, ambos liofilizados. Os resultados de cada dieta são a média das 9 réplicas (indivíduos) e a quantificação foi baseada na resposta do sinal de absorvância (comprimento de onda a 450 nm), e foi traçada uma recta de calibração com uma solução padrão de licopeno e os resultados expressos em μg por g de base seca.

O método de quantificação do licopeno foi completamente validado, com o objectivo da uniformização dos critérios utilizados de modo a demonstrar que as condições em que é praticado possuem as características necessárias para a obtenção de resultados robustos em relação à qualidade e à quantidade. Os métodos de ensaio envolvem manipulações que não podem ser controladas e estão susceptíveis de acumularem erros que podem ser sistemáticos e/ou aleatórios, podendo em algumas situações alterar de forma significativa o resultado final. A validação do método utilizado para a quantificação do licopeno foi realizada de acordo com o Guia da Relacre n.º 13 (Relacre, 2000).

2.5. Análise Estatística

Todos os resultados obtidos foram tratados estatisticamente com auxílio dos programas Excel[®] e Statistica 8.0[®]. Inicialmente, formularam-se duas hipóteses que permitiram tomar decisões acerca das características das amostras analisadas: uma hipótese nula (H_0) na qual se admitiu a igualdade entre amostras e uma hipótese alternativa (H_a) na qual se admitiu a existência de diferenças significativas entre as amostras. A aceitação ou não da hipótese nula depende do nível de significância observado (p -value) e do adoptado ($\alpha = 0,05$). Quando o p -value é maior ou igual ao valor adoptado a hipótese nula é aceite e quando é menor a hipótese nula é rejeitada (Sokal e Rohlf, 1969). Para comparar as características de duas amostras independentes aplicou-se o teste t-student e nos casos em que se pretendeu comparar mais do que duas amostras, recorreu-se à análise de variância (ANOVA). Ambos os testes se baseiam na comparação de médias. Antes de efectuar a ANOVA, foi necessário testar os pressupostos em que esta se baseia (normalidade e homogeneidade), aplicando os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Levene. Para os

dados que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias, aplicou-se o teste One Way ANOVA. Em seguida, aplicou-se o teste Tukey que permitiu identificar, efectivamente, as diferenças e/ou igualdades entre os grupos analisados. Nos casos em que não se verificou pelo menos um dos pressupostos da ANOVA, passou-se ao teste não-paramétrico Kruskal-Wallis. Neste teste assume-se que a variável em consideração é contínua e que é medida numa escala ordinal, isto é, em 'ranks', em vez de ser em médias. Como se assume que as amostras em comparação têm origem na mesma distribuição ou em distribuições com a mesma mediana, a interpretação do teste Kruskal-Wallis é idêntica à do teste One Way ANOVA. Posteriormente, determinaram-se as diferenças e/ou igualdades com um teste de comparações múltiplas. Para determinar a existência de uma relação entre os teores de gordura e colesterol nas amostras, calculou-se o coeficiente de correlação de Pearson e a significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$ (Dowdy *et al.*, 2004).

III RESULTADOS e DISCUSSÃO

3.1. Avaliação dos ácidos gordos e licopeno das dietas

3.1.1. Determinação do perfil de ácidos gordos

O valor nutricional das dietas em estudo é determinado em grande parte pelo perfil de ácidos gordos. Da análise do perfil de ácidos gordos das 6 dietas foram identificados 21 ácidos gordos, sendo os PUFA os que se encontram em maior quantidade na sua composição, variando entre 44 e 56% (dieta administrada ao G4 e nas dietas do G1 e G2, respectivamente). Na figura 7 estão representadas as principais classes de ácidos gordos (SFA, MUFA e PUFA), a quantidade de AA, EPA e DHA e a razão $\omega 3/\omega 6$ presente nas dietas. Dos PUFA identificados, o LA é o que se encontra em maior quantidade, seguido do ALA, e em menor quantidade do AA, EPA e DHA. Dos MUFA identificados, o ácido palmitoleico (16:1 ω 9) e o ácido oleico (18:1 ω 9) são os mais abundantes. O ácido palmítico (16:0) e o ácido esteárico (18:0) são os SFA identificados em maior quantidade e variaram entre 19 e 31% (dieta 1 e 2 e dieta 4, respectivamente).

Analisando os SFA presentes nas dietas administradas aos 6 grupos, observa-se que existem diferenças significativas entre elas. As dietas do grupo G1 (a) e G2 (a) são diferentes das restantes, no entanto, apresentam semelhanças com a dieta do grupo G5 (ab). Por outro lado, a dieta do G3 (bc) regista semelhanças com a dieta do grupo G5 (ab) e a dieta do grupo G6 (cd). A dieta do grupo G4 (d) apresenta o valor mais elevado de SFA (31%) e é diferente de todas as restantes, no entanto, apresenta características em comum com a dieta do grupo G6 (cd) (Figura 7).

Nos MUFA constatamos que as dietas dos grupos G3 (a) e G5 (a) são diferentes da dieta do grupo G4 (b), todavia, estas dietas evidenciaram características comuns às dietas dos grupos G1, G2 e G6 (ambos (ab)).

Da análise dos PUFA, verifica-se uma diminuição dos valores do grupo G1 ao G6, sendo esta proporcional ao aumento de SFA. As dietas dos grupos G1 e G2 registam os valores mais elevados de PUFA; estas dietas têm incorporado na sua composição óleo de soja que é rico em PUFA $\omega 6$, nomeadamente, o LA. A dieta do grupo G4 (a) é estatisticamente diferente da dieta do grupo G3 (b) e dos grupos G1 e G2 (ambos (c)), no entanto, evidencia proximidade com a dieta do grupo G6 (ab) e, este por sua vez, apresenta características comuns ao G3 (b). A dieta do grupo G5 (bc) registou semelhanças com as dietas dos grupos G3 (b) e com G1 e G2 (ambos (c)) (Figura 7).

No caso específico do AA, não se apuraram diferenças significativas entre as 6 dietas tendo-se registado valores muito baixos (Figura 7).

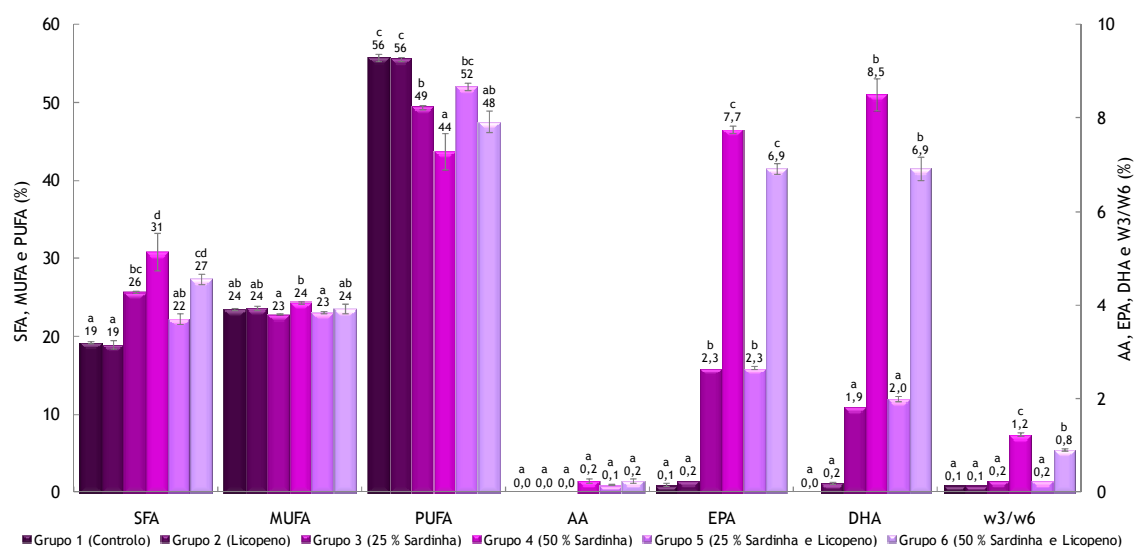


Figura 7 - Perfil de ácidos gordos das dietas administradas aos 6 grupos. Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Analisando a figura 7, observa-se que os níveis de EPA aumentaram e corresponderam à suplementação de sardinha nas dietas. Registaram-se diferenças significativas nas dietas dos grupos G1 (a) e G2 (a) que apresentaram os níveis mais baixos de EPA (0,1 e 0,2%, respectivamente). Os grupos das dietas suplementadas com 25 % de sardinha (G3 e G5, ambos (b)) registaram o valor intermédio de EPA (2,3 %), seguidos dos grupos G4 (c) e G6 (c) suplementados com 50 % de sardinha com o valor mais elevado de EPA (7,7 e 6,9 %, respectivamente).

No caso do DHA as diferenças significativas encontradas foram ao nível da suplementação das dietas com 50 % de sardinha, ou seja, as dietas dos grupos G4 (b) e G6 (b) são estatisticamente diferentes das dietas dos grupos G1, G2, G3, e G5 (ambos (a)) (Figura 7).

Em relação à razão de $\omega 3/\omega 6$, a dieta do grupo G4 (c) é estatisticamente diferente da dieta do grupo G6 (b), que por sua vez são diferentes das dietas dos grupos G1, G2, G3 e G5 (ambos (a)). Evidencia-se deste modo o efeito da suplementação das dietas com 50 % de sardinha na razão $\omega 3/\omega 6$ que mostrou valores superiores (1,2 e 0,8) aos referidos pela FAO e pela WHO e a FAO, que recomendam dietas cuja razão $\omega 3/\omega 6$ estejam compreendidas entre 1/5 a 1/4 (Martin *et al.*, 2006). No entanto, valores da razão $\omega 3/\omega 6$ na ordem de 0,5 (1/2) e 0,33 (1/3) têm sido sugeridos nas dietas uma vez que facilitam a conversão do ácido ALA em EPA (0,5%) e EPA em DHA (0,005%) (Wang *et al.*, 2006) (Figura 7).

3.1.2. Determinação do licopeno

A quantidade de licopeno presente nas dietas dos 6 grupos foi determinada e os resultados obtidos estão apresentados na figura 8. De acordo com o delineamento experimental da composição do valor nutricional das dietas dos grupos G1, G3 e G4, o valor do licopeno presente na ração foi nulo (Figura 8). A quantidade de licopeno presente nas dietas dos G2 e G5 (25% sardinha e licopeno) foi de 9 mg/g de ração e de 7 mg/g de ração na dieta do G6 (50 % sardinha e licopeno). A quantidade de licopeno na dieta do grupo 6 deveria ser idêntica ao G2 e G5, uma vez que a quantidade de tomate em pó (fonte do licopeno) se manteve na formulação das dietas, por este motivo podemos afirmar que a diferença se deve a limitações experimentais. Por outro lado, poderá existir uma interação entre o licopeno e o aumento do nível de ácidos gordos (50% sardinha).

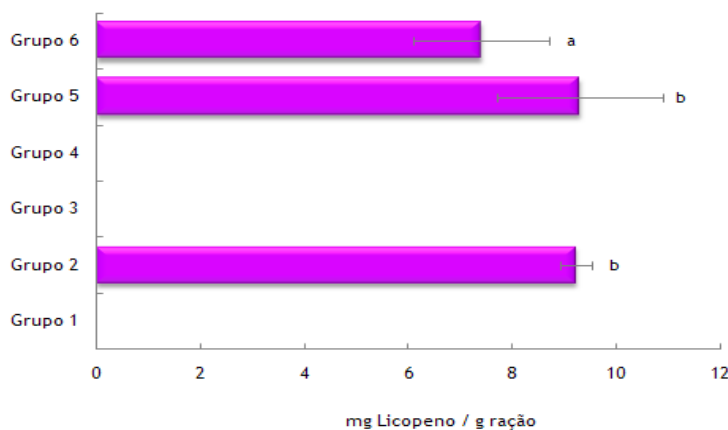


Figura 8 - Concentração de licopeno presente nas dietas dos 6 grupos. Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Vários estudos têm sido realizados no âmbito da biodisponibilidade do licopeno e dos constituintes dos alimentos (Bramley, 2000; van Het Hof *et al.*, 2000; Boileau *et al.*, 2002). A biodisponibilidade dos constituintes do alimento é um processo complexo, que envolve a digestão, a captação intestinal e sua absorção, distribuição para os tecidos e sua utilização (Bramley, 2000). Existem vários factores que podem interferir na biodisponibilidade dos carotenóides, tais como a matriz alimentar, a forma isomérica do licopeno, a quantidade e o tipo de gordura presente na dieta, o processo de absorção, as interações entre os carotenóides, a presença de fibras alimentares e o processamento dos alimentos (Bramley, 2000; van Het Hof *et al.*, 2000; Boileau *et al.*, 2002;).

3.2. Avaliação dos ácidos gordos e do licopeno no fígado, tecido adiposo e nos eritrócitos

A selecção dos tecidos/células nos estudos de incorporação dos ácidos gordos na dieta é um factor de extrema importância. Isto porque cada tecido repercute de uma forma particular a dieta do indivíduo. Assim, o conjunto de tecidos escolhidos deve dar uma panorâmica global dos efeitos da dieta no organismo. Tal significa a selecção de tecidos de rápida reacção a alterações dietéticas, bem como outros tecidos que reagem a mudanças continuadas do tempo. Desta ponderação resultou, no presente estudo, a determinação do perfil de ácidos gordos no fígado, no tecido adiposo e nos eritrócitos.

3.2.1 Determinação dos ácidos gordos no fígado

O fígado é um órgão com inúmeras funções no organismo, armazena e metaboliza as vitaminas lipossolúveis, como a A, D, E e K, a hidrossolúvel B12 (factor antianémico) e os minerais como o ferro e o cobre, que são adquiridos através da alimentação. Regula a composição do sangue e sintetiza proteínas plasmáticas, e juntamente com o baço elimina os glóbulos vermelhos envelhecidos. O fígado regula as taxas de glicose no sangue, participa nos vários mecanismos energéticos do organismo, elimina as toxinas, faz a filtragem mecânica das bactérias, controla o equilíbrio hidro-salínico e segrega a bÍlis. Para além destas funções, sintetiza lipoproteínas que se ligam ao colesterol e aos fosfolípidos, que são os componentes essenciais das membranas plasmáticas das células. O fígado também usa o colesterol para a produção da bÍlis, que é uma substância alcalina com capacidades digestivas (<http://www.todabiologia.com/anatomia/figado.htm>).

Analisando a figura 9 (A), verificamos que a suplementação das dietas dos grupos G3 e G4 com 25 e 50% de sardinha modificou o perfil de ácidos gordos no fígado em relação ao grupo controlo (G1). Apesar de se registarem diferentes valores de SFA para os grupos G3 (33,8 %) e G4 (35,3%), constatamos que estatisticamente não se verificaram diferenças significativas, ou seja, o facto das dietas dos grupos G3 (b) e G4 (b) serem suplementadas com diferentes percentagens de sardinha não afectou a percentagem de incorporação de SFA. No entanto, nos grupos G3 e G4 verificaram-se diferenças face ao grupo G1 (controlo), ou seja, os níveis de incorporação de SFA aumentaram de 30,6% (G1) para 33,8% (G3) e 35,3% (G4).

Comparando o grupo G1 com os grupos G3 e G4 para os MUFA, observamos que a dieta do grupo G1 (ab) apresenta características semelhantes aos grupos G3 (a) e G4 (b), contudo o G3 é diferente do G4. Da análise da figura 9 (A), constatamos que o nível de MUFA do grupo G3 (13,1%) foi inferior aos do G1 (15,6%) e do G4 (18,9%). O que nos permite concluir que a dieta suplementada com 25% de sardinha baixa os níveis de incorporação/deposição dos MUFA no fígado.

Analisando o perfil de PUFA nos grupos G1 (53,0%), G3 (52,2%) e G4 (43,6%), verificamos que a suplementação de 25 e 50% de sardinha diminui a percentagem de PUFA no fígado. Apesar de se registar uma diminuição ligeira entre os grupos G1 e G3 dos níveis de PUFA, estes são estatisticamente idênticos (b), no entanto, são diferentes do grupo G4 (a) que apresentou uma diminuição de aproximadamente 10%. Assim, pode-se inferir que a suplementação das dietas com sardinha provocou uma diminuição dos níveis de PUFA $\omega 6$ no fígado. Sabe-se que os lípidos provenientes da dieta são transportados do intestino para o fígado e posteriormente são transportados do fígado para os restantes tecidos do organismo. Regressam novamente ao fígado e são eliminados para o intestino (Figura 9 (A)).

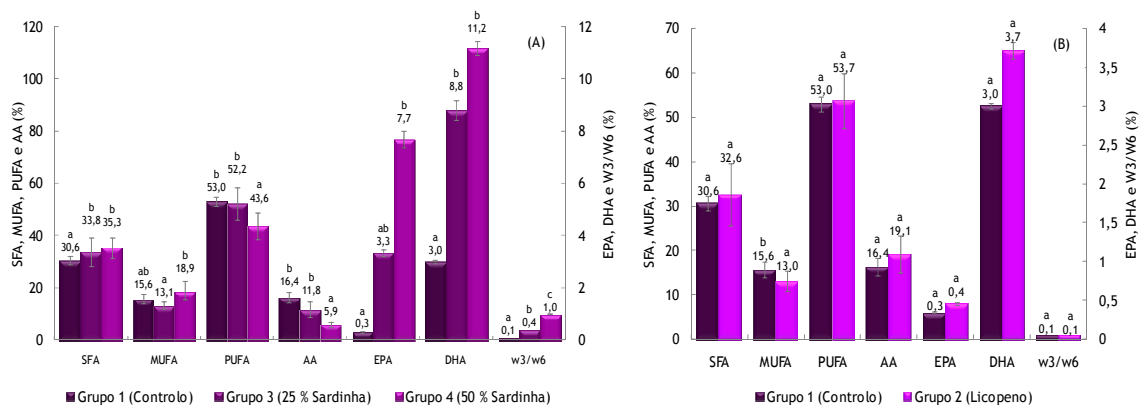


Figura 9 - Perfil de ácidos gordos do fígado (n=9), (A) - G1, G3 e G4; (B) - G1 e G2. Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

A percentagem do AA diminuiu de 16,4% no grupo G1 (b) (controlo) para 11,8% no G3 (b) e 5,9% no G4 (a), no entanto, a análise estatística apenas identifica diferenças significativas no grupo G4 suplementado com 50% de sardinha face ao G1 e G3, ou seja, o grupo G3, cuja dieta foi suplementada com 25% de sardinha, não é significativamente diferente do grupo controlo (G1), contrariamente ao efeito da dieta no grupo G4 que baixa o nível de AA cerca de 10,5% (Figura 9 (A)).

O nível de EPA no fígado registado no grupo G1 foi de 0,3% e aumentou no G3 (3,3%) e no G4 (7,7%), ou seja, a ingestão de dietas ricas em sardinha aumenta o

nível de incorporação do EPA de acordo com o referido anteriormente. Na análise estatística, o grupo G4 é significativamente diferente do G1, o que está de acordo com a composição da dieta controlo e da dieta com 50% de sardinha. Todavia, em relação ao grupo G3 (ab) de dieta suplementada com 25% de sardinha, apesar de o teor de EPA ter aumentado cerca de 3% face ao G1 (a), as diferenças não são significativas e este grupo apresenta características comuns ao G1 e ao G4 (b) (Figura 9 (A)).

Os níveis de DHA no fígado aumentaram de 3,0% no grupo G1 (a) para 8,8% no G3 (b) e 11,2% no G4 (b). Na análise estatística constatamos que existem apenas diferenças que têm origem na ausência/presença de sardinha, isto é, o grupo G1 é diferente dos grupos G3 e G4. No entanto, o facto de, por um lado, a dieta do G4 ter na sua composição o dobro de sardinha face à dieta do G3 e, por outro, dos grupos não se distinguirem estatisticamente, permite-nos afirmar que apesar dos níveis de ingestão de DHA serem superiores, tal não se reflecte ao nível da sua incorporação (Figura 9 (A)), contudo Harris e von Schacky (2004) verificaram o oposto.

Em relação à razão $\omega 3/\omega 6$ existente no fígado, verificou-se um aumento do grupo G1 (0,1) para o G3 (0,4) e o G4 (1,0). O aumento verificado entre o G3 e o G4 é de 0,6 e verifica-se que os três grupos são estatisticamente distintos, isto é, a suplementação de sardinha nas dietas dos grupos G3 e G4 tem um efeito positivo na razão $\omega 3/\omega 6$ (Figura 9 (A)).

Na análise da figura 9 (B), constatamos que o facto da dieta do grupo G2 ter sido suplementada com licopeno, não conduziu a diferenças significativas na percentagem de SFA, MUFA, PUFA, AA, EPA, DHA e na razão $\omega 3/\omega 6$ comparativamente com o G1, isto é, o licopeno não interfere no perfil de ácidos gordos dos grupos, uma vez que a única variável na comparação G1 vs G2 é a ausência ou presença de licopeno.

Na figura 10 (A) está representado o perfil de ácidos gordos dos grupos G2, G3 e G5, visando verificar se a presença/ausência licopeno influencia o perfil de ácidos gordos no fígado, em particular, nos grupos cujas dietas foram suplementadas com 25% de sardinha. Analisando as principais classes de ácidos gordos, ou seja, SFA, MUFA e PUFA, apenas se verificam diferenças significativas em relação aos MUFA, uma vez que para os SFA e PUFA não existem diferenças entre os grupos. Ao nível do AA observam-se níveis mais elevados no G2 (19,1%), face ao G3 (11,8%) e G5 (10,7%). Mais uma vez, se verifica a diminuição dos níveis de AA em função da suplementação de sardinha, dado o AA e o EPA (abundante na sardinha) competirem pela mesma enzima na biosíntese dos eicosanóides (Figura 10 (A)). O AA é o principal constituinte

das membranas usado na biosíntese de eicosanóides, a presença de EPA promove a competição entre estes e o EPA é preferencialmente incorporado diminuindo a incorporação de AA.

No caso específico do EPA, DHA e da razão $\omega 3/\omega 6$ verificou-se um aumento nos grupos G3 (b) e G5 (b) face ao G2 (a), isto quer dizer que o enriquecimento das dietas com sardinha tem um efeito positivo na deposição do EPA e DHA no fígado. No entanto, não se verificaram alterações significativas por causa do licopeno na composição das dietas dos grupos G3 e do G5, isto é, os dois grupos são estatisticamente iguais (b). Os valores obtidos para a razão $\omega 3/\omega 6$ são iguais o que nos permite constatar que a presença de licopeno na dieta de G5 não tem qualquer tipo de influência no valor da razão $\omega 3/\omega 6$ (Figura 10 (A)).

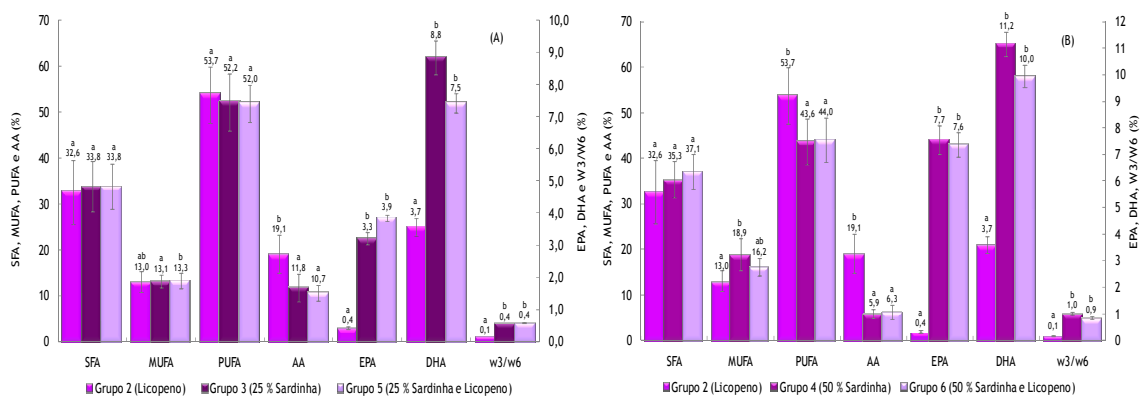


Figura 10 - Perfil de ácidos gordos do fígado (n=9), (A) - G2, G3 e G5; (B) - G2, G4 e G6. Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Na figura 10 (B) observamos o efeito do licopeno no perfil de ácidos gordos do fígado relativamente aos grupos alimentados com dietas suplementadas com 50% de sardinha (G4 e G6). Comparando o grupo G2 com o G4 e o G6, verificamos que o teor em SFA não é afectado pela incorporação de 50% de sardinha (G4 e G6) nas dietas e que a dieta do grupo controlo de licopeno (G2) não apresenta diferenças significativas em relação aos grupos G4 e G6. O mesmo não se verifica em relação aos MUFA, isto é, a suplementação de 50% de sardinha nas dietas dos grupos G6 (16,2%) e G4 (18,9%) causa um aumento significativo dos níveis de MUFA face ao grupo G2 (13,0%). Contudo, a presença/ausência de licopeno (G4 e G6) não influencia a deposição dos MUFA no fígado uma vez que os grupos são estatisticamente iguais.

Em relação ao efeito do licopeno na deposição dos PUFA no fígado, verificamos uma diminuição dos seus níveis do grupo G2 (53,7%) para o G4 (43,6%) e o G6 (44,0%). A análise estatística permite verificar que os grupos G4 (a) e G6 (a) são idênticos,

isto é, o licopeno não tem influência na deposição de PUFA no fígado, mas diferem do grupo G2.

Continuando a análise da figura 10 (B), verifica-se um nível mais elevado de AA no perfil de ácidos gordos do fígado do grupo G2 (19,1%) em relação aos grupos G4 (5,9%) e G6 (6,3%). Estatisticamente, o G2 (b) é diferente do G4 (a) e G6 (a); verificamos deste modo que a suplementação das dietas com 50% de sardinha provoca a diminuição dos níveis de AA. Tal deve-se ao facto da sardinha ser pobre em AA, ao passo que o óleo de soja é rico em LA (óleo presente na dieta do grupo G2), o qual se converte em AA.

A suplementação das dietas dos grupos G4 e G6 com 50% de sardinha tem um efeito positivo no nível de EPA, DHA e na razão $\omega 3/\omega 6$. Por outro lado, mais uma vez se verifica que a ausência/presença de licopeno não tem qualquer tipo de influência nos níveis de EPA, DHA e na razão $\omega 3/\omega 6$ nos perfis dos grupos G4 (b) e G6 (b) (Figura 10 (B)).

3.2.2 Determinação dos ácidos gordos no tecido adiposo

O perfil de ácidos gordos no tecido adiposo permite estudar a dieta administrada a longo prazo (1 a 2 anos), devido à estabilidade da sua composição (Baylin *et al.*, 2002). No tecido adiposo, os ácidos gordos são armazenados sob a forma de triacilgliceróis.

Segundo um estudo de Baylin *et al.* (2002) o rácio de deposição dos ácidos gordos no tecido adiposo humano (percentagem de ácidos gordos no tecido / percentagem de ácidos gordos na dieta) é $0,44 \pm 0,13$ para o AA, $0,21 \pm 0,06$ para o EPA e $0,17 \pm 0,06$ para o DHA, e a razão $\omega 3/\omega 6$ 0,064.

No tecido adiposo depositam-se os ácidos gordos com menor importância para as funções vitais. Os principais ácidos gordos do tecido adiposo são os SFA e os MUFA e são importantes para a produção de hormonas, eicosanóides, etc. Para Baylin *et al.*, (2002) parece existir uma modesta relação entre a ingestão de peixe e o depósito de DHA no tecido adiposo em humanos, no entanto, para outros investigadores esta relação não se verifica e não existe uma relação linear entre a ingestão de peixe e o aumento dos níveis de EPA e DHA no tecido adiposo (Baylin *et al.*, 2002; Andersen, *et al.*, 1999; Katan, *et al.*, 1997).

Analisando a figura 11 (A), verificamos que a suplementação das dietas dos grupos G3 e G4 com 25 e 50% de sardinha modificou o perfil de ácidos gordos no tecido adiposo em relação ao grupo controlo (G1). Os valores de SFA aumentaram de 21,5%

(G1) para 30,4% (G3) e para (47,0 %) (G4), isto é, o facto de as dietas serem suplementadas com diferentes percentagens de sardinha afecta os níveis de deposição no tecido adiposo e leva a resultados estatisticamente diferentes.

Comparando o grupo G1 com os grupos G3 e G4 para os MUFA, observamos que o grupo G1 (a) é estatisticamente diferente dos grupos G3 e G4, no entanto, o aumento da percentagem de sardinha nas dietas dos grupos G3 e G4 não altera os níveis de MUFA, uma vez que não são estatisticamente diferentes (Figura 11 (A)).

Analisando o perfil de PUFA dos grupos G1 (36,7%), G3 (34,4%) e G4 (26,7%), verificamos que a suplementação de 25 e 50% de sardinha diminui a percentagem de PUFA (principalmente ω_6) no tecido adiposo e que os 3 grupos são estatisticamente diferentes (Figura 11 (A)).

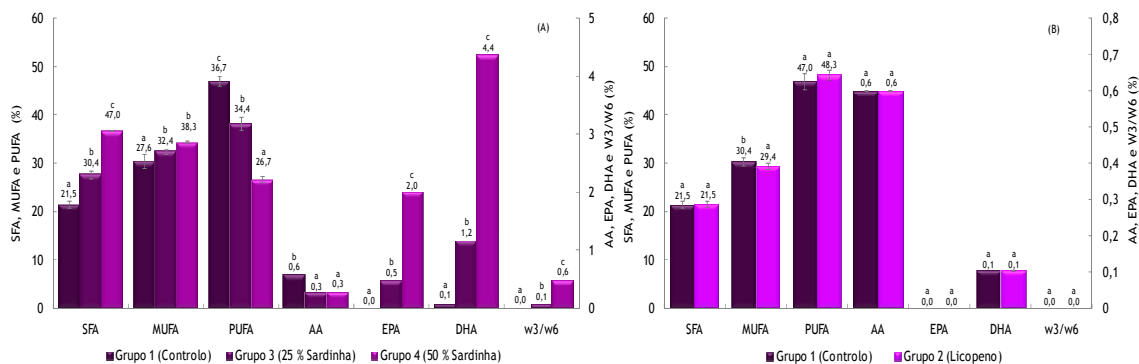


Figura 11 - Perfil de ácidos gordos do tecido adiposo (n=9), (A) - G1, G3 e G4; (B) - G1 e G2. Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

A suplementação das dietas com 25 e 50% de sardinha (G3 e G4) modificou os níveis de incorporação do AA, pois, o nível deste ácido gordo diminuiu de 0,6 (G1) para 0,3% (G3 e G4), e é estatisticamente diferente nos grupos G3 e G4 (Figura 11 (A)).

Relativamente ao EPA, ao DHA e à razão ω_3/ω_6 , observa-se um aumento nos grupos suplementados com sardinha (G3 (b) e G4 (c)) face ao grupo G1 (a). Os três grupos em estudo são estatisticamente diferentes (Figura 11 (A)) (Harris e von Schacky, 2004). O facto de termos níveis de EPA e DHA superiores no tecido adiposo aquando da suplementação do dobro da sardinha mostra que em termos de incorporação a dose ministrada ultrapassa as necessidades do organismo para as funções vitais.

Na figura 11 (B) o facto de a dieta do G2 ter sido suplementada com licopeno, não conduz a diferenças significativas na percentagem de SFA, MUFA, PUFA, AA, EPA, DHA e na razão ω_3/ω_6 comparativamente com o G1, isto é, a incorporação de licopeno não modifica o perfil de ácidos gordos do grupo G2.

Na figura 12 (A) está representado o perfil de ácidos gordos dos grupos G2, G3 e G5, visando apurar se a presença/ausência de licopeno influencia o perfil de ácidos gordos no tecido adiposo, em particular, nos grupos cujas dietas foram suplementadas com 25% de sardinha. Examinando as principais classes de ácidos gordos, ou seja, SFA, MUFA e PUFA, apenas se verificam diferenças significativas em relação aos MUFA, uma vez que para os SFA e PUFA não existem diferenças estatísticas significativas entre os grupos G3 e G5. A suplementação com sardinha nas dietas G3 e G5 aumenta os níveis de SFA no tecido adiposo e são por isso estatisticamente diferentes do grupo G2 (a), porém a presença de licopeno na dieta do grupo G5 não influencia os níveis de SFA face ao G3. Por outro lado, baixa os níveis de deposição dos PUFA e mais uma vez se atesta que a presença de licopeno não influencia os níveis de deposição no tecido adiposo.

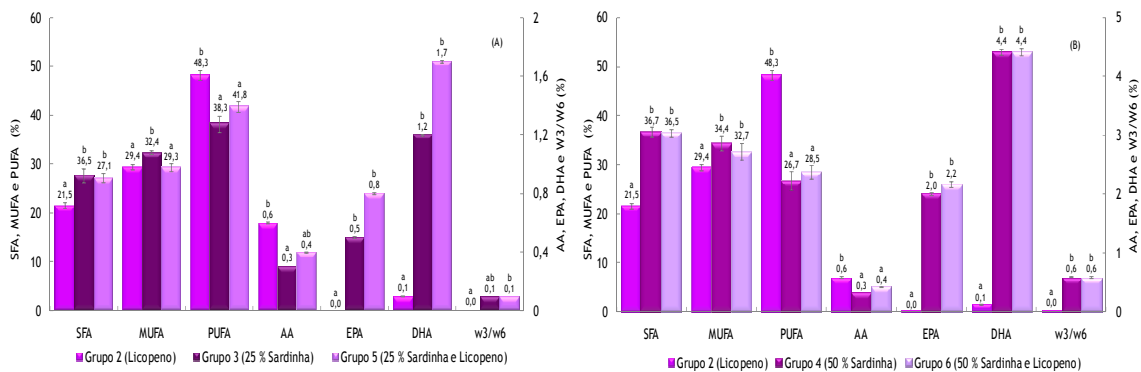


Figura 12 - Perfil de ácidos gordos do tecido adiposo (n=9), (A) - G2, G3 e G5; (B) - G2, G4 e G6. Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre os grupos (p < 0,05).

No que respeita ao AA observam-se níveis mais elevados no G2 (0,6 %), face ao G3 (0,3 %) e G5 (0,4 %). Em relação ao efeito do licopeno, G5 (ab) apresenta semelhança com os grupos G2 (b) e G3 (a), que são estatisticamente diferentes, ou seja, o licopeno influencia ligeiramente, mas positiva e significativamente, a deposição de AA no tecido adiposo (Figura 12 (A)).

No caso específico do EPA e do DHA e da razão $\omega 3/\omega 6$ verificou-se um aumento nos grupos G3 e G5 face ao G2, isto quer dizer que o enriquecimento das dietas com sardinha tem um efeito positivo na deposição do EPA e DHA no tecido adiposo. No entanto, não se verificaram alterações significativas por causa da presença do licopeno na composição das dietas dos grupos G3 e G5, isto é, os dois grupos não são estatisticamente diferentes (b), com excepção do G3 (ab) para a razão $\omega 3/\omega 6$ que apresenta afinidade com o grupo G2 (a) e G5 (b), o que nos permite constatar que a

presença de licopeno na dieta de G5 interfere no valor da razão $\omega 3/\omega 6$ (Figura 12 (A)).

Na figura 12 (B) observa-se o efeito do licopeno no perfil de ácidos gordos do tecido adiposo relativamente aos grupos alimentados com dietas suplementadas com 50% de sardinha (G4 e G6). Confrontando o grupo G2 com o G4 e G6, verifica-se que o teor em SFA não é afectado pela incorporação de 50% de sardinha (G4 e G6) nas dietas e que o grupo controlo de licopeno (G2 (a)) exhibe diferenças significativas em relação aos grupos G4 e G6 (ambos (b)). Registou-se uma situação idêntica em relação aos MUFA, isto é, a presença/ausência de licopeno (G4 e G6) não influencia a deposição dos MUFA no tecido adiposo, uma vez que os grupos são estatisticamente iguais.

Em relação ao efeito do licopeno na deposição dos PUFA no tecido adiposo, verificamos uma diminuição dos seus níveis do grupo G2 (48,3%) para o G4 (26,7%) e G6 (28,5%). A análise estatística permite verificar que os grupos G4 (a) e G6 (a) não são diferentes, isto é, o licopeno não tem influência na deposição de PUFA no tecido adiposo, mas diferem do grupo G2 (b) (Figura 12 (B)).

Continuando a análise da figura 16 (B), verifica-se uma diminuição nos níveis de AA no perfil de ácidos gordos do tecido adiposo. Estatisticamente, o G2 (b) é diferente do G4 (a) e G6 (a), verificamos deste modo que o licopeno não interfere com a deposição de AA no tecido adiposo.

No caso específico do EPA, DHA e da razão $\omega 3/\omega 6$, verifica-se um aumento nos grupos G4 (b) e G6 (b) face ao G2 (a), isto quer dizer que o enriquecimento das dietas com sardinha tem um efeito positivo na deposição do EPA e DHA no tecido adiposo. No entanto, não se verificaram alterações significativas por causa do licopeno na composição das dietas do grupo G4 e do G6, isto é, os dois grupos não são estatisticamente diferentes (b). Os valores obtidos para a razão $\omega 3/\omega 6$ não são diferentes, o que permite constatar que a presença de licopeno na dieta de G6 não tem qualquer tipo de interferência no valor da razão $\omega 3/\omega 6$ (Figura 12 (B)).

3.2.3 Determinação dos ácidos gordos nos eritrócitos

O perfil de ácidos gordos dos eritrócitos pode ser utilizado como biomarcador da incorporação dos ácidos gordos PUFA $\omega 3$ nas dietas e reflecte uma resposta mais rápida ao modo como os ratos estão a ser alimentados, além disso, os eritrócitos não levantam dificuldades de colheita e tratamento (estabilidade de armazenamento a -

80 °C) (Hodson *et al.*, 2002). De facto, os eritrócitos apresentam uma forte correlação com as variações do conteúdo lipídico de células e tecidos, sendo assim possível a sua utilização como marcador dietético (Arterburn *et al.*, 2006; Harris e von Shacky, 2004). Os eritrócitos têm um período de vida de aproximadamente 120 dias, pelo que reflectem a dieta ingerida no mês anterior, sendo considerados, de acordo com Arab (2003), marcadores de média duração.

Analisando a figura 13 (A), verifica-se que a suplementação das dietas dos grupos G3 e G4 com 25 e 50% de sardinha modificou o perfil de ácidos gordos nos eritrócitos. Apesar de se registarem diferentes valores de SFA e de MUFA para os grupos G1, G3 e G4, constata-se que estatisticamente não se verificam diferenças significativas, ou seja, o facto das dietas dos G3 e G4 serem suplementadas com 25 e 50% de sardinha não provocou alterações significativas no valor total dos SFA e MUFA nos eritrócitos. Verificou-se um aumento da percentagem de PUFA no G3 (49,2%) em relação ao G1 (42,6%). Apesar do grupo G4 ter sido suplementado com o dobro da quantidade de sardinha, este grupo não apresentou maior incorporação de PUFA, quando comparado com o G3.

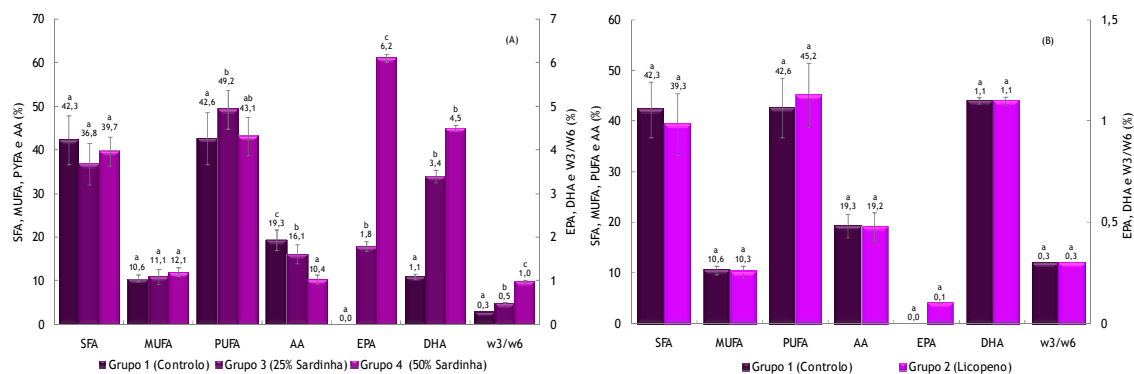


Figura 13 - Perfil de ácidos gordos dos eritrócitos (n=9), (A) - G1, G3 e G4; (B) - G1 e G2. Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

A suplementação das dietas com 25 e 50% de sardinha (G3 e G4) modificou os níveis de incorporação do AA, pois, o nível deste ácido gordo diminuiu para 16,1 e 10,4%, no G3 e G4, respectivamente, face ao valor do G1 (19,3%). Os três grupos em estudo são estatisticamente diferentes, ou seja, a suplementação da sardinha baixa os níveis de deposição do AA nos eritrócitos (Figura 13 (A)) (Harris e von Schacky, 2004).

Relativamente ao EPA, enquanto o G1 não contém este ácido gordo, o G3 apresenta um teor de 1,8 e o G4 de 6,2%, sendo os três grupos estatisticamente diferentes (Figura 13 (A)) (Harris e von Schacky, 2004).

Para o DHA, verificou-se também um aumento nos grupos suplementados com sardinha, ou seja de 1,1% no G1, para 3,4 e 3,5% no G3 e G4, respectivamente. Contudo, não se registaram diferenças significativas entre o G3 e G4, ou seja, o aumento da suplementação de sardinha no G4 não provocou alterações significativas nos níveis de incorporação do DHA nos eritrócitos, contudo Harris e von Schacky (2004) verificaram que após a suplementação de PUFA ω 3 os níveis de DHA aumentaram.

Prisco *et al.* (1996) demonstraram que a suplementação com PUFA ω 3 modifica o perfil de ácidos gordos dos fosfolípidos na membrana dos eritrócitos, o que é corroborado pelo presente estudo dado o aumento dos níveis de EPA e DHA.

Em relação à razão ω 3/ ω 6, verificou-se um aumento quando comparado com o G1 (0,3), nos grupos G3 (0,5) e G4 (1,0). O aumento verificado entre o G3 e o G4 é proporcional ao da suplementação da sardinha (25 e 50% de sardinha). Segundo um estudo realizado por Cao *et al.* (2006) durante 8 semanas, verificou-se um aumento dos PUFA ω 3 fornecidos pela dieta nas membranas dos eritrócitos, de 6,1 para 10,2%, e de acordo com Skeaff *et al.* (2006), os ácidos gordos nos eritrócitos têm o mesmo intervalo de tempo dos ácidos gordos no plasma, isto é, de 2 semanas.

Na figura 13 (B), é observável que o facto de a dieta do G2 ter sido suplementada com licopeno, não conduz a diferenças significativas na percentagem de SFA, MUFA, PUFA, AA, EPA, DHA e na razão ω 3/ ω 6 comparativamente com o G1, isto é, que a incorporação de licopeno não interfere no perfil de ácidos gordos do grupo G2.

Na figura 14 (A) está representado o perfil de ácidos gordos dos grupos G2, G3 e G5, de modo, a verificar se o licopeno induz alterações nos eritrócitos, em particular na situação em que há 25% de sardinha suplementada na dieta dos grupos. Analisando as classes de ácidos gordos, ou seja, SFA, MUFA e PUFA, não há diferenças significativas, permitindo afirmar que a suplementação de licopeno nas dietas não modifica o perfil global de ácidos gordos nos eritrócitos. Porém, numa análise mais específica observa-se a diminuição dos níveis de AA do G2 (19,2%), para o G3 (16,1%) e G5 (14,5%), no entanto, através da análise estatística o G2 é diferente do G5, mas o G3 apresenta características comuns ao G2 e ao G5, assim, mais uma vez se verifica que o licopeno não altera o perfil de ácidos gordos dos eritrócitos.

A suplementação das dietas dos grupos G3 e G5 com 25% de sardinha tem um efeito positivo nos níveis de EPA e DHA e na razão ω 3/ ω 6. A ausência/presença de licopeno não tem qualquer tipo de influência nos níveis de EPA, DHA e na razão ω 3/ ω 6 nos perfis dos grupos G3 (b) e G5 (b) (Figura 14 (A)).

Na figura 14 (B) observa-se o efeito do licopeno (G2) no perfil de ácidos gordos dos eritrócitos, com especial atenção aos grupos suplementados com 50% de sardinha (G4 e G6). Comparando o grupo G2 com o G4 e G6, verifica-se que o teor em SFA não é afectado pela incorporação de 50% de sardinha (G4 e G6) nas dietas e que o grupo controlo de licopeno (G2) não apresenta diferenças significativas em relação aos grupos G4 e G6. O mesmo não sucede em relação aos MUFA, isto é, a suplementação de 50% de sardinha nas dietas dos grupos G4 (b) e G6 (b) causa um aumento significativo dos níveis de MUFA face ao grupo G2 (a). Contudo, a presença/ausência de licopeno (G4 e G6) não influencia a deposição dos MUFA nos eritrócitos uma vez que os grupos não são estatisticamente diferentes.

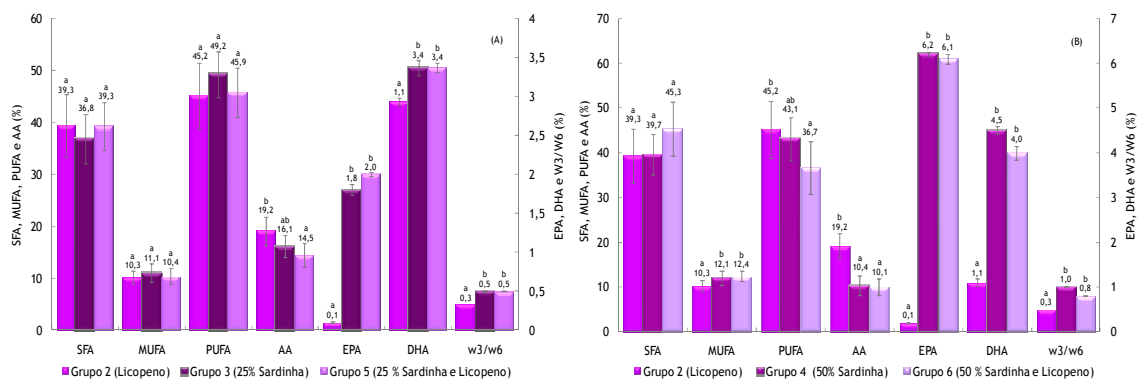


Figura 14 - Perfil de ácidos gordos dos eritrócitos (n=9), (A) - G2, G3 e G5; (B) - G2, G4 e G6. Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Em relação ao efeito do licopeno na deposição dos PUFA nos eritrócitos, verificamos uma diminuição dos seus níveis do grupo G2 (45,2%) para o G4 (43,1%) e G6 (36,7%). A análise estatística permite verificar que os grupos G2 (b) e G6 (a) são estatisticamente diferentes, no entanto, o grupo G4 (ab) apresenta semelhanças a ambos, isto é, o licopeno interfere na deposição de PUFA nos eritrócitos (Figura 14 (B)).

Continuando a análise da figura 14 (B), verifica-se um nível mais elevado de AA no perfil de ácidos gordos dos eritrócitos do grupo G2 (19,2%) em relação aos grupos G4 (10,4%) e G6 (10,1%). Estatisticamente, o G2 (b) é diferente do G4 (a) e G6 (a), verifica-se deste modo que a suplementação das dietas com 50% de sardinha provoca a diminuição dos níveis de AA (Bandarra *et al.*, 1997; Ramel *et al.*, 2010).

A suplementação das dietas dos grupos G4 e G6 com 50% de sardinha tem um efeito positivo nos níveis de EPA e DHA e na razão $\omega 3/\omega 6$. Dos resultados, decorre que a ausência/presença de licopeno não tem qualquer tipo de influência nos níveis

de EPA eDHA e na razão $\omega 3/\omega 6$ nos perfis dos grupos G4 (b) e G6 (b) (Figura 14 (B)) (Bandarra *et al.*, 1997; Ramel *et al.*, 2010).

3.2.4 Comparação dos ácidos gordos no fígado, tecido adiposo e nos eritrócitos

Na figura 15 estão representados, para cada grupo, as principais classes de ácidos gordos, o AA, EPA, DHA e a razão $\omega 3/\omega 6$ com o objectivo de avaliar as diferenças significativas entre os níveis de deposição nos eritrócitos, no fígado e no tecido adiposo.

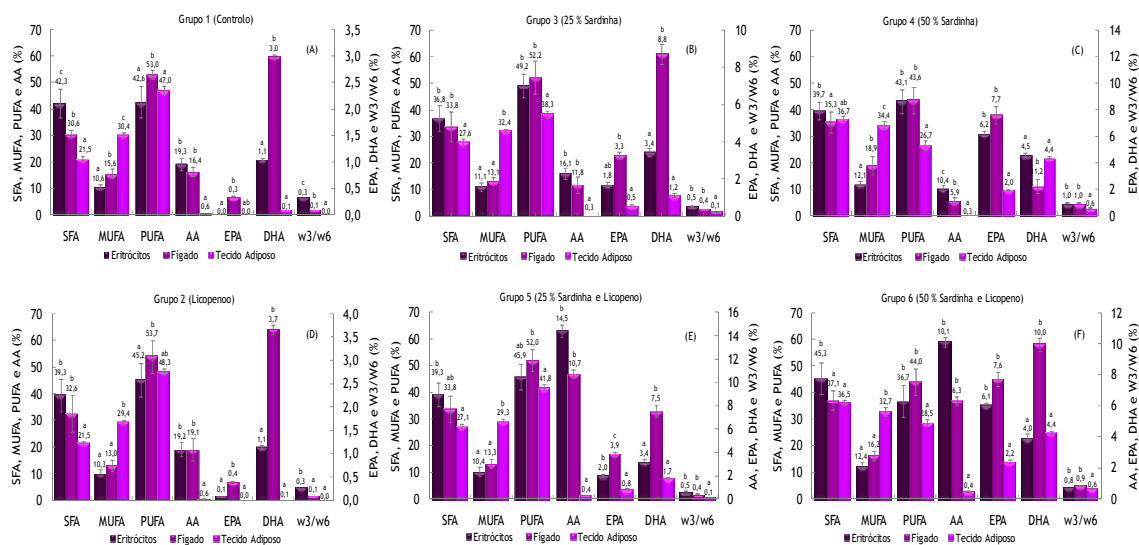


Figura 15 - Perfil de ácidos gordos dos eritrócitos, do fígado e do tecido adiposo (n=9), (A) - G1, (B) - G3, (C) - G4, (D) - G2, (E) - G5 e (F) - G6. Diferentes letras correspondem a diferenças significativas (p < 0,05).

No grupo G1, observa-se que os SFA estão presentes em maior quantidade nos eritrócitos, e em menor quantidade no tecido adiposo e que são estatisticamente diferentes, ou seja, a deposição dos SFA difere nos eritrócitos (c), no fígado (b) e no tecido adiposo (a). O mesmo acontece com os MUFA, no entanto, estão em menor quantidade nos eritrócitos (a) e em maior quantidade no tecido adiposo (c). Em relação aos PUFA observam-se diferenças no fígado (b) face aos eritrócitos (a) e ao tecido adiposo (a), ou seja, a deposição de PUFA foi maior no fígado. No que diz respeito ao AA, o tecido adiposo (a) é estatisticamente diferente do fígado (b) e dos eritrócitos (b). Para o EPA, os eritrócitos (a) são diferentes do fígado (b), no entanto o tecido adiposo (ab) mostrou ter semelhanças com ambos. Relativamente ao DHA, o

fígado (b) distingue-se dos eritrócitos (a) e do tecido adiposo (a). No que concerne à razão $\omega 3/\omega 6$, os eritrócitos são estatisticamente diferentes do fígado (b) e do tecido adiposo, no entanto, é maior nos eritrócitos (c) e menor no tecido adiposo (a) (Figura 15 (A)).

Na Figura 15 (B) constata-se que, no grupo G3, para os SFA, MUFA, PUFA, AA, e razão $\omega 3/\omega 6$, o tecido adiposo é estatisticamente diferente dos eritrócitos e do fígado, e os níveis de deposição no tecido adiposo foram menores do que nos eritrócitos e no fígado, excepto nos MUFA em que se verificou o inverso. No caso específico do EPA, o fígado (b) é estatisticamente diferente do tecido adiposo (a) e os eritrócitos (ab) evidenciam semelhanças entre ambos. Para o DHA, o fígado apresenta teores mais elevados do que os eritrócitos (a) e do que o tecido adiposo (a).

No grupo G4, verifica-se para os SFA que os eritrócitos (b) são estatisticamente diferentes do fígado (a), no entanto, o tecido adiposo não se diferencia de ambos (ab). Em relação aos MUFA, o nível de deposição é menor nos eritrócitos (a) e maior no tecido adiposo (c). Para o AA, o nível de deposição foi superior nos eritrócitos (c) e inferior no tecido adiposo (a). Para os PUFA, EPA e razão $\omega 3/\omega 6$, o tecido adiposo (a) é estatisticamente diferente dos eritrócitos (b) e do fígado (b). Para o DHA, o nível de deposição foi superior no fígado que é estatisticamente diferente dos eritrócitos (a) e do tecido adiposo (a) (Figura 15 (C)).

No grupo G2, verificamos que os eritrócitos e o fígado não são estatisticamente diferentes para o caso dos SFA, dos MUFA e do AA, e diferentes do tecido adiposo. Para os PUFA, os eritrócitos (a) são estatisticamente diferentes do fígado (b), e o tecido adiposo apresenta semelhanças entre ambos (ab). Relativamente ao EPA e ao DHA, o fígado (b) é estatisticamente diferente dos eritrócitos (a) e do tecido adiposo (a), contrariamente ao registado na razão $\omega 3/\omega 6$, em que os eritrócitos (b) são diferentes do fígado (a) e do tecido adiposo (a) (Figura 15 (D)).

No grupo G5, o nível de SFA dos eritrócitos é estatisticamente diferente do tecido adiposo, no entanto, o fígado evidenciou características em comum com ambos os tecidos. Para os MUFA, AA e razão $\omega 3/\omega 6$, os eritrócitos e o fígado são estatisticamente diferentes do tecido adiposo. Quanto aos PUFA, os eritrócitos assemelham-se ao fígado e ao tecido adiposo, o qual é estatisticamente diferente do fígado. Para o EPA, não existem semelhanças entre os eritrócitos (b), o fígado (c) e o tecido adiposo (a), contrariamente ao DHA, em que os eritrócitos e o tecido adiposo evidenciam semelhanças entre si (Figura 15 (E)).

Na figura 15 (F) observa-se o caso específico do grupo G6, em que os eritrócitos e o fígado mostram semelhanças para o caso dos MUFA, PUFA, AA, EPA e razão $\omega 3/\omega 6$ e são estatisticamente diferentes do tecido adiposo. No que concerne à fracção dos SFA, os eritrócitos (b) são estatisticamente diferentes do fígado (a) e do tecido adiposo (a). Para o DHA, o fígado (b) é estatisticamente diferente dos eritrócitos (a) e do tecido adiposo (a).

Comparando os 6 grupos entre si, é possível concluir que a deposição de SFA e de MUFA evidenciou mais diferenças significativas e que o tipo de dieta condiciona o seu local (tecido/órgão) e a quantidade de deposição. Os níveis de deposição de SFA no tecido adiposo foram baixos, ou seja, estes ácidos gordos não funcionaram como reserva, e este acontecimento poderá ter origem na composição inicial das dietas de controlo, uma vez que os óleos vegetais são pobres em SFA e ricos em MUFA. Devido ao facto dos ratos terem ingerido níveis baixos de SFA para serem posteriormente utilizados como reserva, estes tiveram de utilizar os MUFA como ácidos gordos de reserva. Os níveis de deposição dos MUFA em todos os grupos foram superiores no tecido adiposo, contrariamente ao AA que registou os níveis mais baixos de deposição no tecido adiposo. Os níveis de deposição do AA nos eritrócitos são semelhantes aos do fígado. Os PUFA e o DHA encontram-se em maior quantidade no fígado para todos os grupos. Para o EPA, verificou-se o mesmo, excepto nos grupos G4 e G6 em que os níveis de deposição são semelhantes aos eritrócitos. A razão $\omega 3/\omega 6$ é menor no tecido adiposo e semelhante no fígado e nos eritrócitos, excepto no grupo G1, em que a deposição nos eritrócitos é superior à do fígado (Figura 15).

Segundo Pawar e Jump (2003), os ácidos gordos PUFA- $\omega 3$, EPA e o DHA, activam a hormona receptora nuclear (PPAR α) presente no fígado, tecido adiposo, etc., com elevado catabolismo ao nível dos ácidos gordos. Esta hormona liga-se ao receptor retinóico (RXR), e em conjunto activam a expressão das enzimas envolvidas na β -oxidação e na lipólise dos triacilgliceróis (Jump, 2004). A PPAR γ também é activada pelo EPA e DHA e inibe a NF κ B e a enzima COX-2, activando a lipase das lipoproteínas. Estas duas hormonas em conjunto diminuem a acumulação dos lípidos no músculo, e no tecido adiposo, ou seja, diminuem a presença de ácidos gordos na forma livre no plasma e melhoram a sensibilidade aos níveis de insulina (Armstrong e Towle, 2001; Jump, 2004). Os resultados obtidos para o tecido adiposo não reflectem esta tendência, uma vez que o nível de deposição de SFA aumentou em função do aumento da suplementação de sardinha, pois como foi referido anteriormente a sardinha é relativamente rica em SFA.

Os PUFA corrigem as anomalias de sinalização insulínica e garantem a homeostase dos níveis de glucose. Este mecanismo de regulação é mediado pelo decréscimo dos níveis dos ácidos gordos sob a forma livre no sangue, pelo armazenamento dos ácidos gordos no tecido adiposo subcutâneo (depósito primário) e pela diminuição da acumulação dos ácidos gordos no tecido adiposo subcutâneo profundo e intra-abdominal (depósitos secundários), músculos, rins, e no fígado, o que representa o depósito ectópico dos ácidos gordos (Nettleton e Katz, 2005; Tirosh *et al.*, 2005; Thorsdóttir *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008a).

Segundo Harris e von Schacky (2004), o índice $\omega 3$, (soma do EPA e do DHA) e a presença de EPA e DHA nas membranas dos eritrócitos reflecte os níveis presentes na membrana cardíaca, e propuseram que os níveis de EPA+DHA reflectiam o conteúdo total dos ácidos gordos. Foi considerado que o índice $\omega 3$ pode ser uma medida do risco para as DC e morte súbita e estudaram diferentes níveis de índice $\omega 3$, e concluíram que para níveis superiores a 8% o risco diminui 90%.

No presente estudo, o índice $\omega 3$ nos eritrócitos apenas foi superior a 8% nos indivíduos dos grupos G4 e G6 (50% sardinha). No fígado, foi superior nos grupos G3, G5, G4 e G6 (25 e 50% de sardinha, respectivamente). No tecido adiposo, os valores foram inferiores a 8% para todos os grupos.

Bandarra *et al.* (1997) estudou o efeito de dietas suplementadas com 20% de óleo de sardinha em ratos wistar (machos) durante 6 meses no perfil de ácidos gordos do fígado e concluiu que os níveis de MUFA são inferiores aos SFA e aos PUFA, o que está em consonância com o presente estudo, porém, as diferenças verificadas por Bandarra *et al.* (1997) foram inferiores às descritas neste estudo.

Contrariamente ao estudo de Bandarra *et al.* (1997) em que o DHA está presente no fígado em maior quantidade (15,2%), o AA foi superior ao DHA para todos os grupos no fígado. O EPA apresentou valores semelhantes aos do grupo G4, 6,7% e 6,2% respectivamente.

De acordo com o referido anteriormente no ponto 1.2.2.1, o ALA é responsável pela produção de EPA e DHA, que são precursores de um grupo de compostos eicosanóides do qual fazem parte prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina, lipoxinas e leucotrienos (Rodrigues e Morais, 2008). O AA é o ácido mais importante da família $\omega 6$, quando as células são activadas por estímulos externos, o AA é transformado em mediador celular tal como os tromboxanos, as prostaglandinas e os leucotrienos, que por sua vez vão activar os leucócitos e as plaquetas, que actuam ao nível da regulação gástrica, entre outras funções (Harris e von Schacky, 2004; DeFilippis, 2006; Martin *et al.*, 2006; Surette, 2008).

A inclusão de ácidos de $\omega 3$ na dieta tem um efeito rápido na composição das membranas celulares em todos os tecidos. Estes ácidos actuam como reservatórios das moléculas biologicamente activas e regulam o ambiente proteico nas membranas, por este motivo, não é surpreendente que eles afectem vários tecidos e as suas funções. No geral, a resposta e a reactividade nas células e nos tecidos enriquecidos com esta fonte lipídica pode explicar a promoção da saúde e o bem-estar (Bandarra *et al.*, 1997; Harris e von Schacky, 2004; Surette, 2008).

3.3 Determinação do licopeno

O licopeno tem sido encontrado no plasma e nos tecidos variando a sua distribuição, e a presença de carotenóides nos tecidos humanos tem sido relatada desde 1990. Os carotenóides e os seus metabolitos podem ser encontrados no soro ou acumulados em tecidos, como o fígado, os pulmões, a mama, a coluna cervical e na pele (Khachik *et al.*, 2002). A quantidade do licopeno foi determinada no fígado e no tecido adiposo, no entanto, apenas foi quantificado no fígado; no tecido adiposo não evidenciou acumulação. No entanto, vários estudos têm demonstrado o contrário, que o licopeno pode ser encontrado no tecido adiposo e que em concentrações elevadas está associado à diminuição do risco do enfarte do miocárdio (Petr e Erdman, 2005; Rao e Agarwal, 1999; Takeoka *et al.*, 2001 *in* Omoni e Aluko, 2005). Os resultados obtidos estão apresentados na figura 16 e de acordo com o delineamento experimental da composição do valor nutricional das dietas dos grupos G1, G3 e G4, o valor do licopeno presente na ração foi nulo (Figura 8). A quantidade de licopeno presente nos grupos G2 e G5 (25% sardinha e licopeno) foi de 127 e 92 mg/g de fígado (dw) e de 17 mg/g de fígado na dieta do G6 (50% sardinha e licopeno) e o grupo G6 revelou ser diferente dos grupos G2 e G5. Os resultados obtidos para o grupo G6 reflectem a quantidade ingerida pelos ratos, que foi inferior à dos grupos G2 e G5, uma vez que estava presente em menor quantidade na dieta (Figura 16). Vários factores podem estar na origem de diferenças tão significativas ao nível da acumulação no fígado, como a absorção, a variabilidade genética entre os indivíduos, entre outras, tendo sido necessário recorrer ao tratamento dos dados pelo método de Grubbs (eliminação dos aberrantes).

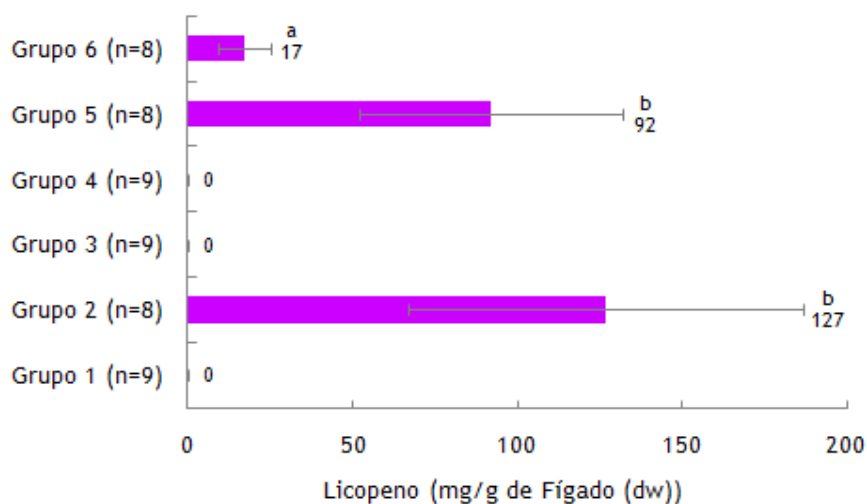


Figura 16 - Concentração de licopeno presente no fígado dos 6 grupos. Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Os dados apresentados na figura 16 indiciam que para além da variação existente nos teores de licopeno nas rações, terá de existir necessariamente um outro factor explicativo das diferenças observadas no fígado. Particularmente, a grande redução observada no teor de licopeno no fígado dos ratos do grupo G6 aponta para a interferência dos PUFA $\omega 3$ (nomeadamente, EPA e DHA) na biodisponibilidade e/ou absorção do licopeno, visto que nas dietas dos grupos G5 e, especialmente, G6 os teores de PUFA $\omega 3$ apresentam as diferenças mais significativas. De facto, foi encontrado um efeito do comprimento da cadeia do ácido gordo na biodisponibilidade de carotenóides, em concreto do β -caroteno (Bauernfeind *et al.*, 1981). Neste estudo foi observada uma correlação inversa entre o comprimento da cadeia e a biodisponibilidade do β -caroteno, isto é, ácidos gordos mais compridos interferem em maior grau na biodisponibilidade deste carotenóide. Assumindo um comportamento idêntico do licopeno, pode-se explicar as variações observadas neste estudo pelo facto do EPA e do DHA possuírem uma cadeia mais longa do que o principal PUFA $\omega 6$ no óleo de soja, LA.

A biodisponibilidade do licopeno parece estar relacionada com as formas isoméricas (*cis* e *trans*), sendo o calor responsável pela modificação da sua forma isomérica. A absorção de licopeno tem-se revelado mais elevada em produtos que utilizam tomates cozidos, e é influenciada pela quantidade de gordura da refeição. Além disso, algumas fibras, como a pectina, podem reduzir a absorção de licopeno devido ao aumento da viscosidade. Alguns carotenóides também podem afectar a biodisponibilidade do licopeno, como, por exemplo, a luteína e o β -caroteno, pois

competem com o licopeno durante a absorção intestinal do licopeno (Boileau *et al.*, 2002 e Bramley, 2000).

O processo de absorção do licopeno ocorre sem gasto de energia, mas pouco se sabe sobre o seu aproveitamento no interior da mucosa. Estudos sugerem que o licopeno é transportado por proteínas específicas ou que migra agregado a gotas lipídicas (Bramley, 2000; Boileau *et al.*, 2002). No enterócito (célula epitelial da camada superficial do intestino delgado), o licopeno não é transformado em vitamina A, como ocorre com outros carotenóides, mas metabolitos oxidativos do licopeno têm sido encontrados no soro humano, embora pouco se saiba sobre os locais e mecanismos envolvidos em sua formação. O licopeno é transportado do enterócito pelos quilomícrons que, pela acção da enzima lipase lipoproteica, vai sendo retirado e absorvido nos vários tecidos, incluindo os adrenais, os renais, o adiposo, o pulmonar e os dos órgãos reprodutivos. O licopeno pode acumular-se no fígado ou ser envolvido pelas lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) e ser levado novamente ao sangue (Bramley, 2000; Boileau *et al.*, 2002).

De acordo com Bramley (2000), 85% do licopeno que é ingerido provém do tomate ou dos seus derivados, no entanto, a quantidade de licopeno apresenta variação sazonal quer em relação à coloração, ao estado de maturação e à variedade do tomate e quer ao local e ao clima. Segundo Giovannucci (2002), o tomate maduro contém níveis de licopeno superiores aos de β -caroteno, e o licopeno é o responsável pela coloração predominantemente vermelha.

Segundo Gartner, a ingestão de molho de tomate cozido em óleo aumentou duas a três vezes a concentração sérica de licopeno no dia seguinte à sua ingestão, todavia, nenhuma alteração foi observada quando administrado o suco de tomate fresco. Altas concentrações de licopeno podem ser encontradas nos produtos à base de tomate, como molhos, polpa, puré, extractos, massa, suco e *ketchup*, no entanto, as concentrações estão dependentes do tomate utilizado e da produção da matéria-prima (Rodríguez-Amaya, 1997). O licopeno está presente principalmente no tecido do pericarpo de tomates, localizado no compartimento celular dos cloroplastos, nos quais cristais são associados à sua estrutura da membrana (Richelle *et al.*, 2002). Contudo, não há ainda uma quantidade específica, mínima ou máxima, prescrita de licopeno que seja considerada segura e adequada para ingestão (Amaya-Farfan, 2001). Segundo Rao e Shen (2002), consumos entre 5 mg e 10 mg de licopeno por dia são suficientes para a obtenção dos benefícios já citados anteriormente, no entanto, para Rao e Agarwal (2000) o consumo médio deveria ser de 35 mg/dia. Convém salientar que estas dosagens são sugeridas para populações saudáveis. Rao e Shen

(2001) sugerem que a dose de ingestão do licopeno deve aumentar consoante o tipo de doença, no entanto, são ainda necessários estudos para determinar a sua quantidade e seus efeitos. Não são consensuais as recomendações nutricionais da ingestão de licopeno e têm-se vindo a realizar estudos sobre os níveis de toxicidade deste composto, no entanto, segundo o relatório da European Food Safety Authority (EFSA, 2010), nenhuma dose mostrou níveis de toxicidade de ingestão diária ao nível do hemograma, urina, na coagulação do sangue e no aumento de peso dos órgãos.

Conforme referido anteriormente, o licopeno está presente maioritariamente nos alimentos na forma *trans* (80 a 97%), sendo a forma *cis* a mais abundante e absorvida no corpo humano, devido ao seu comprimento reduzido e à sua solubilidade nas micelas. O pH ácido do estômago parece contribuir, em pequena parte, na transformação de isómeros do licopeno *all-trans* para *cis*. Além disso, tem-se sugerido que isómeros lineares *all-trans* podem, prontamente, agregar-se dentro do intestino e formar cristais, reduzindo substancialmente a sua absorção pelas micelas.

Segundo Boileau *et al.* (2002) a forma *cis* apresentou maior biodisponibilidade no estudo realizado em que compararam a biodisponibilidade do licopeno nas diferentes formas isoméricas *in vivo*, sendo preferencialmente incorporada nos quilomícrons. Os mesmos autores testaram a biodisponibilidade do licopeno *in vitro*, e também observaram que a forma *cis* foi a que registou maior biodisponibilidade. O licopeno sintético parece ser equivalente ao licopeno natural em relação à sua biodisponibilidade, com semelhante conteúdo isomérico (Boileau *et al.*, 1999; Hoppe *et al.* 2003).

IV. CONCLUSÕES

As doenças cardiovasculares e a obesidade têm na actualidade um papel de extrema importância uma vez que estão na iminência de serem consideradas uma pandemia ao nível mundial.

Os resultados do presente estudo demonstraram que a ingestão de dietas com moderada restrição calórica e a suplementação das dietas com 25 e 50 % de sardinha provocam modificações no perfil de ácidos gordos do fígado, dos eritrócitos e do tecido adiposo.

Os PUFA estão em maior quantidade no fígado, nos eritrócitos e no tecido adiposo, e os níveis de AA, EPA, DHA, e da razão $\omega 3/\omega 6$ reflectiram a influência das diferentes dietas.

A deposição de SFA e de PUFA foi maior no fígado e nos eritrócitos contrariamente à deposição dos MUFA que foi maior no tecido adiposo.

O aumento do EPA e da razão $\omega 3/\omega 6$ está associado à diminuição do AA para todos os grupos no fígado, nos eritrócitos, e no tecido adiposo. Os níveis mais baixos de deposição do AA ocorreram no tecido adiposo. A razão $\omega 3/\omega 6$ aumenta, uma vez que os PUFA $\omega 6$ das dietas dos grupos G3 e G4 foram substituídos pelos PUFA $\omega 3$ (25 e 50% sardinha).

O aumento da suplementação de sardinha (25 e 50%) nas dietas dos grupos G3 a G6 não promoveu uma deposição significativa de DHA no fígado e nos eritrócitos, no entanto, no tecido adiposo esse aumento foi significativo. Uma possível explicação para que o DHA tenha aumentado no tecido adiposo, talvez esteja relacionado com o facto deste ser um tecido (matriz) mais homogéneo e os ácidos gordos estarem mais disponíveis na forma de triacilgliceróis. Devido às diferenças na natureza do fígado e dos eritrócitos, aos processo de análise na quebra das membranas (limitações analíticas), à variabilidade genética e a outros factores que possam ter influenciado a libertação dos ácidos gordos, o aumento de DHA não foi tão significativo no fígado e nos eritrócitos. Por outro lado, o facto de termos níveis de EPA e DHA superiores no tecido adiposo aquando da suplementação do dobro da sardinha mostra que em termos de incorporação a dose ministrada ultrapassa as necessidades do organismo para as funções vitais.

O licopeno apenas foi incorporado no fígado. Em relação à presença do licopeno e apesar dos MUFA na dieta G5 ser diferente da G3, concluímos na generalidade, que o licopeno não interfere na incorporação dos ácidos gordos no fígado, nos eritrócitos e no tecido adiposo para os níveis de 25 e 50% de sardinha. No entanto, o facto da

concentração de ácidos gordos ω_3 aumentar provoca um efeito antagónico na incorporação de licopeno no fígado. Num estudo futuro o tempo de intervenção deveria ser prolongado para 6 meses com o intuito de verificar se os níveis de DHA correspondem à suplementação administrada no fígado e nos eritrócitos. Outro factor a ter em conta em futuros trabalhos será o delineamento de dietas utilizando doses intermédias de suplementação de sardinha e de licopeno.

Estudos futuros deveriam reanalisar a influência dos ácidos gordos na concentração do licopeno no fígado, prevendo o aumento dos níveis de licopeno proporcional ao aumento da dose de ω_3 de modo a perceber qual é o efeito/interferência existente entre os ácidos gordos e o licopeno.

De modo a compreender a complexidade da molécula do licopeno e da relação que possa existir nos processos de isomerização, deveria ser usada outra coluna de HPLC, que permitisse separar o licopeno nos isómeros *cis* e *trans*.

V. REFERÊNCIAS

Agarwal, S., Rao, V.A., (2000). Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Canadian Medical Association Journal*, 163, 739-744.

AHA (2010). Statistical fact sheet - Populations. 2009 Update. Documento obtido da internet (acedido em Outubro de 2010). <http://www.americanheart.org/downloadable/heart/1236204012112INTL.pdf>.

Al, M.M., Van Houwelingen, A.C., Kester, A.D.M., Hasaart, T.H.M., De Jong, A.E.P, Hornstra, G. (1995). Maternal essential fatty acid patterns during normal pregnancy and their relationship to the neonatal essential fatty acid status. *British Journal of Nutrition*, 74, 55-68.

Amaya-Farfan, J., Domene, S.M.A., Padovani, R.M., (2001). DRI: Síntese comentada das novas propostas sobre recomendações nutricionais para antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 14, 71-78.

Andersen, L.F., Solvoll, K., Johansson, L.R., Salminen, I., Aro, A., Drevon, C.A. (1999). Evaluation of a food frequency questionnaire with weighed records, fatty acids, and alpha-tocopherol in adipose tissue and serum. *The American Journal of Epidemiology*, 150, 75-87.

Arab, L. (2003). Biomarkers of fat and fatty acid intake. *Journal of Nutrition*, 133, S925-932.

Armstrong, M. B., Towle, H. C. (2001). Polyunsaturated fatty acids stimulate hepatic UCP-2 expression via a PPAR α -mediated pathway. *The American Journal of Physiology - Endocrinology Metabolism*, 281, E1197-1204.

Arterburn, L.M., Hall, E.B., Oken, H. (2006). Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83, S1467-1476.

Bandarra, N.M., Barata, J.D., Batista, I., Nunes, M.L., Bruges, M., Nascimento, C., Dickson, J., Empis, J.M. (1997). Influence of sardine oil supplements on fatty acid profile and cholesterol levels the rat. *Elsevier Science*, 609-619.

Bauernfeind, J.C., Adams, C.R., Marusich, W.L. (1981). Carotenes and vita-A precursors in animal feed. In: Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors (Bauernfeind, J.C., ed.). Academic Press, *San Diego*, pp. 563-653.

Baylin, A., Kabagambe, E.K., Siles, X., Campos, H. (2002). Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 750-757.

Boileau, T.W.M., Boileau, A.C., Erdman, J.W. (2002). Bioavailability of all-*trans* and *cis*-Isomers of Lycopene. *Experimental Biology and Medicine*, 227, 914-919.

Boileau, A.C., Merchen, N.R., Wasson, K., Atkinson, C.A., Erdman, J.W. (1999). *Cis*-lycopene is more bioavailable than *trans*-lycopene *in vivo* in lymph-cannulated ferrets. *Journal of Nutrition*, 129, 1176-1181.

Bose, K.S.C., Agrawal, B.K. (2007). Effect of lycopene from cooked tomatoes on serum antioxidant enzymes, lipid peroxidation rate and lipid profile in coronary heart disease. *Singapore Medical Journal*, 48, 415-420.

Bramley, P.M. (2000). Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry*, 54, 233-236.

Breslow, J.L. (2006). N-3 fatty acids and cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 1477S-1482S.

Campos, L.S. (1998). Entender a bioquímica: O metabolismo fundamental em animais e plantas. *Escolar Editora*, p.683.

Cao, J., Schwichtenberg, K.A., Hanson, N.Q., Tsai, M.Y. (2006). Incorporation and clearance of ω -3 fatty acids in erythrocyte membranes and plasma phospholipids. *Clinical Chemistry*, 52, 2265-2272.

Canene-Adams, K., Campbell, J.K., Zaripheh, S., Jeffery, E.H., Erdman Jr., J.W. (2005). The tomato as a functional food. *Journal of Nutrition*, 135, 1226-1230.

Carpentier, Y.A., Portois, L., Malaisse, W. (2006). N-3 fatty acids and the metabolic syndrome. *The American Journal Clinical Nutrition*, 83, 1499S-1504S.

Cohen, Z., Vonshak, A., Richmond, A. (1988). Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red algae *Porphyridium cruentum*: correlation to growth rate. *Journal of Phycology*, 24, 328-332.

Covington, M.B. (2004). Omega-3 fatty acids. *American Academy of Family Physicians*, 70, 133-140.

DeFilippis, A.P., Sperling, L.S. (2006). Understanding omega-3's. *American Heart Journal*, 151, 564-570.

Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K., Liu, R.H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3010-3014.

Dowdy, S., Weardon, S., Chilko, D., (2004). Statistics for Research. *Wiley-Interscience* (3rd Ed.), New Jersey, pp.272-313.

Engler, M.M., Engler, M.B., Malloy, M.J., Paul, S.M., Kulkarni, K.R., Mietus-Snyder, M.L. (2005). Effect of docosahexaenoic acid on lipoprotein subclasses in hyperlipidemic children (The Early Study). *The American Journal of Cardiology*, 95, 869-871.

Erdman, J.W., Ford, N.A., Lindshield, B.L. (2009). Are the health attributes of lycopene related to its antioxidant function? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483, 229-235.

EFSA (2010). Statement on the divergence between the risk assessment of lycopene by EFSA and the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Journal of EFSA*, 8, 1676, 1-13.

Fehily, A.M., Pickering, J.E., Yarnell, J.W.G., Elwood, P.C. (1994). Dietary indices of atherogenicity and thrombogenicity and ischaemic heart disease risk: The Caerphilly Prospective Study. *British Journal of Nutrition*, 71, 249-257.

Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Abreu, R.M.V. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 1543-1560.

Gartner, C., Stahl, W., Sies, H. (1997). Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *American Journal Clinical Nutrition*, 66, 116-22.

Ghosh, S., Kewalramani, G., Yuen, G., Pulinilkunnil, T., An, D., Innis S.M., Allard, M.F., Wambolt, R.B., Qi, D., Abrahani, A., Rodrigues, B. (2006). Induction of mitochondrial nitrate damage and cardiac dysfunction by chronic provision of dietary ω 6 polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 41, 1413-1424.

Giovannucci, E. (2002). A review of epidemiological studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer. *Experimental Biology and Medicine*, 227, 852-859.

Harris, W.S., von Schacky, M.D.C. (2004). The omega-3 index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Preventive Medicine*, 39, 212-220.

Hodson, L., Skeaff, C.M., Wallace, A.C., Arribas, G.L.B. (2002). Stability of plasma and erythrocyte fatty acid composition during cold storage. *Clinica Chimica Acta*, 321, 63-67.

Hoppe, P.P., Kramer, K., van den Berg, H., Steenge, G., van Vliet, T. (2003) Synthetic and tomato-based lycopene have identical bioavailability in humans. *European Journal of Nutrition*, 42, 272-278.

Horton, H.R., Moran, L.A., Ochs, R.S., Rawn, J.D., Scrimgeour, K.G. (1996). Principles of Biochemistry. *Prentice Hall* (2nd Ed), USA, p. 832.

Huss, H.H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical Paper*. Roma (Itália), 348, 195 pp.

Jump, D.B. (2004). Fatty acid regulation of gene transcription. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 41, 41-78.

Katan, M.B., Desslypere, J.P., van Birgelen, A.P., Penders, M., Zegwaard, M. (1997). Kinetics of the incorporation of dietary fatty acids into serum cholesteryl esters, erythrocyte membranes, and adipose tissue: an 18-month controlled study. *Journal of Lipid Research*, 38, 2012-2022.

Khachik, F., Carvalho, L., Bernstein, P.S., Muir, G.J., Zhao, D., Katz, N.B. (2002). Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. *Experimental Biology and Medicine*, 227, 845-851.

Lepage, G., Roy, C.C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in one-step reaction. *Journal of Lipid Research*, 27, 114-119.

Martin, C.A., Almeida, V.V., Ruiz, M.R., Visentainer, J.E.L., Matshushita, M., Souza, N.E., Visentainer, J.V. (2006). Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods. *Revista de Nutrição*, 19, 761-770.

Mooradian, A.D., Haas, M.J., Wong, N.C.W. (2006). The effect of selected nutrients on serum HDL cholesterol and apoprotein A-I levels. *Endocrine Reviews*, 27, 2-16.

Omoni, A.O., Aluko, R.E. (2005). The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 344-350.

Nettleton, J.A., Katz, R. (2005). N-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and type 2 diabetes: a review. *Journal of the American Dietetic Association*, 105, 428-440.

Pawar, A., Jump, D.B. (2003). Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in rat primary hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 35931-35939.

Petr, L., Erdman, J.W. (2005). Lycopene and risk of cardiovascular disease. In: Carotenoids and retinoids: Molecular aspects and health issues. Packer, L., Obermuller-Jevic, U., Kraemer, K., Sies, H. (Eds.), AOCS Press, Champaign, pp. 204-217.

Prates, J.A.M., Quaresma, M.A.G., Bessa, R.J.B., Fontes, C.M.G., Alfaia, C.M.P. (2006). Simultaneous HPLC quantification of total cholesterol, tocopherols and β -carotene in Barrossã-PDO veal. *Food chemistry*, 94, 496-477.

Prisco, D., Filippini, M., Francalanci, I., Paniccia, R., Gensini, G.F., Abbate, R., Semen, G.G.N. (1996). Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid intake on phospholipid fatty acid composition in plasma and erythrocytes. *Journal of the American College of Nutrition*, 63, 925-932.

Ramel, A., Martinez, J.A., Kiely, M., Bandarra, N.M., Thorsdóttir, I. (2010). Moderate consumption of fatty fish reduces diastolic blood pressure in overweight and obese European young adults during energy restriction. *Journal of Nutrition*, 26, 168-174.

Rao, A.V., Shen, H. (2002). Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress. *Nutrition Research*, 22, 1125-1131.

Rao, A.V., Agarwal, S. (2000). Role of anti-oxidant lycopene in cancer and heart disease. *Journal of the American College of Nutrition*, 19, 563-569

Rao, A.V., Agarwal, S. (1999). Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. *Nutrition Research*, 19, 305-323.

Relacre (2000). Validação de métodos internos de ensaios em análise química. Guia Relacre, 13, (1.^a Ed), Lisboa.

Richelle, M., Bortlik, K., Liardet, S., Hager, C., Lambelet, P., Baur, M. (2002). A food-based formulation provides lycopene with the same bioavailability to humans as that from tomato paste. *Journal of Nutrition*, 132, 404-8.

Rodrigues, P.O., Sanguinetti, M.C., Rodrigues, A.M.A, Morais, M.G. (2008). Produtos da pesca, saúde e bem-estar. In: Produtos da pesca: Valor nutricional e importância para a saúde e bem-estar dos consumidores, Nunes, M.L., Batista, I.,

Bandarra, N.M., Morais, M.G., Rodrigues, P.O. (Eds.). Publicações Avulsas do IPIMAR, n.º 18: Lisboa.

Rodrigues, P.O., Morais, M.G. (2008). Produtos da pesca, saúde e bem-estar. In: Produtos da pesca: Valor nutricional e importância para a saúde e bem-estar dos consumidores, Nunes, M.L., Batista, I., Bandarra, N.M., Morais, M.G., Rodrigues, P.O. (Eds.). Publicações Avulsas do IPIMAR, n.º 18: Lisboa.

Rodriguez-Amaya, D.B. (2001). A guide to carotenoid analysis in foods. OMNI Research, ILSI Human Nutrition Institute, One Thomas Circle, NW. Washington, DC 20005-5802, USA, p. 64.

Sena, A. (2008). Produtos da pesca, saúde e bem-estar. In: Produtos da pesca: Valor nutricional e importância para a saúde e bem-estar dos consumidores, Nunes, M.L., Batista, I., Bandarra, N.M., Morais, M.G., Rodrigues, P.O. (Eds.). Publicações Avulsas do IPIMAR, n.º 18: Lisboa.

Sharoni, Y., Danielenko, M., Levy, J. (2000). Molecular mechanism for the anticancer activity of the carotenoid lycopene. *Drug Development Research*, 50, 448-456.

Shoelson, S.T., Lee, J., Goldfine, A.M. (2006). Inflammation and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 116, 1793-1801.

Sies, H. (2007). Total antioxidant capacity: Appraisal of concept. *The Journal of Nutrition*, 137, 1493-1495.

Shi, J. (2000). Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 1-42.

Simopoulos, A.P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. The center of genetics, nutrition and health. *Experimental Biology and Medicine*, 233, 674-688.

Simopoulos, A.P. (2002). Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *American College of Nutrition*, 21, 495-505.

Skeaff, C.M., Hodson, L., McKenzie, Z.E. (2006). Dietary-induced changes in fatty acid composition of human plasma, platelet, and erythrocyte lipids follow a similar time course. *Journal of Nutrition*, 136, 565-569.

Socol, M.C.H., Oetterer, M. (2003). Seafood as functional food. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46, 443-454.

Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1969). *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. W. H. Freeman and Co. New York, pp. 158-169.

Souza, S.M.G., Anido, R.J.V., Tognon, F.C. (2007). Fatty acids omega-3 and omega-6 in fish nutrition: sources and relations. *Ciências Agroveterinárias*, 6, 63-71.

Surette, M.E. (2008). The science behind dietary omega-3 fatty acids (Review). *Canadian Medical Association*, 178, 177-180.

Takeoka, G.R., Dao, L., Flessa, S., Gillespie, D.M., Jewell, W.T., Huebner, B. (2001). Processing effects on lycopene content and antioxidant activity of tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3713-3717.

Thorsdóttir, I., Tomasson, H., Gunnarsdóttir, I., Grísladóttir, E., Kiely, M., Parra, M.D., Bandarra, N.M., Shaafsma, G., Martínéz, J.A. (2007). Randomized trial of weight-loss-diets for young adults varying in fish and fish oil content. *International Journal of Obesity*, 31, 1560-1566.

Tirosh, A., Shai, I., Tekes-Manova, D. (2005). Normal fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes in young men. *The New England Journal of Medicine*, 353, 1454-1462.

van Het Hof, K.H., West, C.E., Weststrate, J.A., Hautvast, J.G. (2000). Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *Journal of Nutrition*, 130, 503-506.

Voutilainen, S., Nurmi, T., Mursu, J., Rissanen, T.H. (2006). Carotenoids and cardiovascular health. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 1265-1271.

Wang, C., Harris, W.S., Chung, M., Lichtenstein, A.H., Balk, E.M., Kupelnick, B., Jordan, H.S., Lau, J. (2006). N-3 fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not α -linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84, 5-17.

Willis, M.S., Wians, F.H. (2003). The role of nutrition in preventing prostate cancer: a review of the proposed mechanism of action of various dietary substances. *Clinica Chimica Acta*, 330, 57-83.

Xavier, M. (2008). Produtos da pesca, saúde e bem-estar. In: *Produtos da pesca: Valor nutricional e importância para a saúde e bem-estar dos consumidores*, Nunes, M.L., Batista, I., Bandarra, N.M., Morais, M.G., Rodrigues, P.O. (Eds.). Publicações Avulsas do IPIMAR, n.º 18: Lisboa.

Young, A.J., Phillip, D.M., Lowe, G.M. (2004). Carotenoid antioxidant activity. In: Carotenoids in health and disease. Krinsky, N.I., Mayne, S.T., Sies, H.T. (Eds), *Marcel Dekker Inc., New York*, pp.105-126.

WebSites consultados de Setembro a Novembro de 2010:

[http://www.google.pt/images/obesidade.](http://www.google.pt/images/obesidade)

[http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:LANumbering.png.](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:LANumbering.png)

[http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:ALANumbering.png.](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:ALANumbering.png)

[http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:EPANumbering.png.](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:EPANumbering.png)

[http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:DHANumbering.png.](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:DHANumbering.png)

[http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:AANumbering.png.](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:AANumbering.png)

[http://www.ehealthmd.com/library/lowercholesterol/LC_what.html.](http://www.ehealthmd.com/library/lowercholesterol/LC_what.html)

[http://www.medmovies.com.](http://www.medmovies.com)

[http://www.dg-saude.pt.](http://www.dg-saude.pt)

[http://www.todabiologia.com/anatomia/figado.htm.](http://www.todabiologia.com/anatomia/figado.htm)