

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



DISSERTAÇÃO

**Efeito da linhaça (*Linum usitatissimum*) em forma triturada,
farelo desengordurado e óleo sobre o perfil lipídico e
fermentação colônica em ratos *Wistar***

Carolina Galarza Vargas

Pelotas, 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

V297e Vargas, Carolina Galarza

Efeito da linhaça (*linum usitatissimum*) em forma triturada, farelo desengordurado e óleo sobre o perfil lipídico e fermentação colônica em ratos Wistar / Carolina Galarza Vargas. Pelotas, 2012.

95 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2012. Orientação: Elizabete Helbig; co-orientação: Giovana Duzzo Gamaro.

1. Nutrição. 2. Fibra dietética. 3. Colesterol. 4. Perfil lipídico. 5. Ácidos graxos de cadeia curta. I.Título.

CDD: 641.1

CAROLINA GALARZA VARGAS

**EFEITO DA LINHAÇA (*Linum usitatissimum*) EM FORMA
TRITURADA, FARELO DESENGORDURADO E ÓLEO SOBRE O
PERFIL LIPÍDICO E FERMENTAÇÃO COLÔNICA EM RATOS
*Wistar***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Elizabete Helbig
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Giovana Duzzo Gamaro

Pelotas, 2012

Banca examinadora:

Profª Drª. Leonor Almeida de Souza Soares

Profª Drª. Adriana Lourenço da Silva

Profª Drª. Elizandra Braganhol

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por ter conduzido minha vida e ter colocado nela a oportunidade desta grande realização.

A “profe” Beti que foi uma grande orientadora, pelos ensinamentos, dedicação, apoio, paciência, parceria, profissionalismo, sensatez, confiança e incentivo em todos os momentos.

À professora Gio pela co-orientação, disposição e eterna boa vontade em me auxiliar sempre que necessário.

Às professoras Leonor, Adri e Eliz pelo apoio como membros da banca, pela valorosa contribuição para o enriquecimento do trabalho.

Aos alunos, que participaram dessa pesquisa. Sem eles nada seria feito. A todos meu profundo agradecimento, por terem acreditado no trabalho e dedicado parte do seu tempo para colaborar com o bom andamento da pesquisa.

Ao professor Rui por ter aberto um espaço em seu laboratório, me auxiliando em algumas análises.

Ao professor Luciano Amarante e seu orientado Júnior por me cederem seu laboratório e auxiliarem com extrema boa vontade.

À minha família, minha irmã Vê e meus avós por torcerem e acreditarem em mim.

Um agradecimento especial àqueles que são a base da minha vida, meus pais, pelo apoio, confiança e amor que depositam em mim. Especialmente à minha mãe que é minha fonte de inspiração, sabedoria, meu maior orgulho, minha amiga de todas as horas, que sonha e batalha ao meu lado na concretização desses sonhos. Mãe sem palavras... E ao meu pai pelo bom coração que tem, pela dignidade, bondade e honestidade. Um exemplo de ser humano! Meu mais sincero muito obrigada! Sem vocês não sou nada! Amos vocês infinitamente!

Ao Filipe que muito mais que um namorado foi e é um grande parceiro, pelo apoio nos momentos difíceis, pela ajuda em todas as horas. Obrigada por compreender minha ausência, minhas mudanças de humor e minhas crises de choro! Tens imensa importância na minha vida, te amo amor!

À duas amigas mais do que especiais que tornam os meus dias mais alegres, que fizeram do meu mestrado uma fase de extrema felicidade em minha vida, Japa

e Dé obrigada pela sincera amizade, acho que devo dizer irmandade, que nasceu e cresce firme e forte entre nós! Amo vocês manas!

À querida Pati Duval, pessoa que admiro muito pela coragem, otimismo e coleguismo, obrigada por todo o carinho, parceria e boa vontade, inclusive pra atualizar meu lattes!

À Eliza pela boa vontade em ajudar e por tantos momentos agradáveis que tivemos juntas!

Às instituições CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de mestrado e FAPERS– Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul ARD processo 10/0489-0 pelo financiamento do projeto.

Às empresas Pazze Ltda de Panambi – RS, pela doação do grão, farelo desengordurado e do óleo, Prozyn BioSolutions e Granotec pela doação das enzimas amiloglicosidase e protease.

Enfim... a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigada!

Sumário

Projeto de pesquisa.....	7
Alterações no projeto de pesquisa.....	41
Artigo 1: Efeito da linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>), farelo desengordurado e óleo de linhaça no metabolismo lipídico e glicídico em ratos <i>Wistar</i>	42
Artigo 2: Efeitos da ingestão de óleo, farelo desengordurado e linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>) em parâmetros fermentativos de ratos <i>Wistar</i>	73

Projeto de Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



Projeto de pesquisa

**Efeito da linhaça (*Linum usitatissimum*), farelo
desengordurado e óleo de linhaça na fermentação colônica
em ratos *Wistar***

Carolina Galarza Vargas

Pelotas, 2010

Lista de tabelas

Tabela 1	Formulação das dietas experimentais.....	27
Tabela 2	Delineamento experimental para avaliar a influência da linhagem em dietas hiperlipídicas nos parâmetros fermentativos e no metabolismo lipídico de ratos.....	28

Lista de abreviaturas e siglas

AGCC	- Ácidos Graxos de Cadeia Curta
ALA	- Ácido α -linolênico
AL	- Ácido linoléico
AIN	- American Intitute of Nutrition
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AACC	- American Association of Cereal Chemists
AOAC	- Association of Official Agricultural Chemist
CG	- Cromatografia Gasosa
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CEEA	- Comitê de Ética e Experimentação Animal
FA	- hidroximetilglutaril coenzima A redutase
HDL	- Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA redutase	- Hidroximetilglutaril coenzima A redutase
IOM	- Institute of Medicine
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade
PUFA	- Polyunsaturated fatty acids
UFPeI	- Universidade Federal de Pelotas
VLDL	- Lipoproteína de muito baixa densidade

Resumo

A crescente morbimortalidade relacionada às doenças crônico-degenerativas não transmissíveis como câncer, diabetes, hipertensão, doenças coronarianas e obesidade representa uma forte ameaça à saúde humana. Essas doenças têm sido apontadas como as maiores causas de morte no mundo, sendo responsáveis por um número estimado de 35 milhões de mortes a cada ano, em torno de 60% de todas as mortes a nível mundial, dados que apontam para a necessidade da adoção de medidas que visam a prevenção e a cura das mesmas. Tendo em vista as propriedades funcionais da linhaça e as diferentes formas de consumo da mesma, este estudo terá por objetivo verificar o efeito da suplementação de dietas hipercolesterolêmicas com óleo, farelo desengordurado e semente de linhaça triturada, em duas concentrações, sobre os parâmetros fermentativos e metabolismo lipídico de ratos.

1 Introdução

A crescente morbimortalidade relacionada às doenças crônico-degenerativas não transmissíveis como câncer, diabetes, hipertensão, doenças coronarianas e obesidade representa uma forte ameaça à saúde humana. Essas doenças têm sido apontadas como as maiores causas de morte no mundo, sendo responsáveis por um número estimado de 35 milhões de mortes a cada ano, em torno de 60% de todas as mortes a nível mundial, dados que apontam para a necessidade da adoção de medidas que visam a prevenção e a cura das mesmas (WHO, 2008).

A população mundial vem demonstrando crescente preocupação com a alimentação e seus constituintes (MARQUES, 2008), uma vez que o tipo e a qualidade da alimentação consumida têm sido mencionados no conjunto dos fatores de relevância para a prevenção de algumas doenças crônico-degenerativas não transmissíveis (LIMA et al., 2000; ALMARIO et al., 2001; CINTRA et al., 2006).

Dessa forma, não raro, pesquisas apontam que maior ou menor ingestão de certos alimentos pode prevenir ou tratar doenças. Esta realidade tem incentivado a indústria alimentícia a investir em produtos saudáveis e nos alimentos com propriedades funcionais. Entre os alimentos com estas características, de acordo com Marques (2008), encontra-se a linhaça (*Linum usitatissimum*).

Esse grão oleaginoso, de cor marrom ou amarelo dourado é rico em ácidos graxos poliinsaturados α -linolênico (ALA) e, em menor quantidade, linoléico (AL), além de conter teores significativos de proteína vegetal, lignanas, fibra alimentar solúvel e insolúvel, goma ou mucilagem, ácidos fenólicos, flavonóides, ácido fólico, vitaminas e minerais. Essas substâncias conferem propriedades funcionais à linhaça, em função dos benefícios que proporcionam à saúde (CHEN et al.; 2007, COLLINS et al.; 2003).

Os teores de fibra alimentar (FA) presentes na linhaça são bastante significativos, pois ela contém 28% de fibra alimentar total, das quais 75% são insolúveis e 25% solúveis, sendo as principais frações de fibra compostas por celulose, mucilagens e lignina (MORRIS, 2001).

As fibras são componentes da dieta que não sofrem digestão no trato superior do sistema digestório, ao atingirem o cólon, podem ser utilizadas como substrato para a fermentação pela microflora bacteriana. A fermentação colônica caracteriza-

se pela utilização anaeróbia destes substratos, com a conseqüente formação de diversos produtos, que promoverão diferentes efeitos fisiológicos locais e sistêmicos (MATIAS, 2007). Destacam-se como os principais alguns gases (dióxido de carbono, hidrogênio e metano), água e ácidos graxos de cadeia curta, sendo os mais importantes o ácido acético, o propiônico e o butírico (GOÑI, 2001).

Os ácidos graxos de cadeia curta estão relacionados com a manutenção do pH intestinal, com o trofismo da mucosa colônica e a proteção da microbiota normal evitando, dessa forma, o crescimento de bactérias patogênicas (GRECA, 2003).

Evidências da literatura mostram que a mucosa do intestino delgado pode absorver ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), dentre esses, o butirato, especialmente, é o melhor combustível para colonócitos contribuindo com 70% de energia para as células da mucosa do cólon, o que contribui para uma mucosa mais resistente a patógenos e carcinógenos (COOK, 1998).

O ácido acético, produzido na fermentação colônica, após ser absorvido, é transportado pela veia porta até o fígado, sendo utilizado periféricamente como fonte de energia e como estrutura para síntese de ácidos graxos de cadeia média e longa. Na ausência de carboidrato pode ser utilizado como substrato para a gliconeogênese (GOÑI, 2001).

Já o ácido propiônico é um importante precursor de rotas biossintéticas como a gliconeogênese. Além disso, o ácido propiônico atua inibindo a enzima hidroximetilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) importante enzima relacionada à síntese de colesterol nos hepatócitos, (TODESCO e col., 1991; FAO/WHO, 1998).

Considerando que as doenças cardiovasculares têm se destacado por serem as principais causas de morte e incapacidade no mundo ocidental (RIEDIGER et al., 2009), e entre um dos principais fatores de risco encontram-se as dislipidemias (LIMA, 2000), torna-se de suma importância avaliar a função hipocolesterolêmica da linhaça. Estudos têm mostrado que a fibra alimentar solúvel contida neste grão pode contribuir para a redução dos níveis de colesterol plasmático através da inibição da absorção intestinal de colesterol e ácidos biliares (MATIAS, 2007). O efeito hipocolesterolêmico da linhaça também é atribuído à presença de ácido α -linolênico e lignanas (BHATHENA et al., 2003).

As pesquisas têm mostrado resultados mais evidentes na redução do risco cardiovascular para o consumo das sementes oleaginosas ao invés do óleo produzido a partir delas, isso se deve pelo fato de que além da fonte de ácidos

graxos benéficos (poli e monoinsaturados), elas são fontes de outros nutrientes que podem auxiliar na redução do risco para doença cardiovascular, como fitosteróis, fibras solúveis, minerais e proteína vegetal (SALES, 2009).

Tendo em vista as propriedades funcionais da linhaça e as diferentes formas de consumo da mesma, este projeto tem por objetivo verificar o efeito da suplementação de dietas hipercolesterolêmicas com óleo, farelo desengordurado e semente de linhaça triturada, em duas concentrações, sobre os parâmetros fermentativos e metabolismo lipídico de ratos.

2 Hipótese

A linhaça possui atividade hipocolesterolêmica, por meio de mecanismos que reduzem o colesterol plasmático e hepático e que aumentam a excreção de gordura pelas fezes. Devido ao alto teor de fibras, esse grão produz aumento do bolo fecal, formação de ácidos graxos de cadeia curta pela fermentação das fibras e conseqüente diminuição do pH do cólon.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Este estudo terá como objetivo investigar a ação fisiológica, causada pela suplementação de dietas hiperlipídicas com óleo, farelo desengordurado e semente de linhaça triturada, em duas concentrações, nos parâmetros fermentativos e no metabolismo lipídico, em ratos adultos.

3.2 Objetivos específicos

Investigar o metabolismo glicídico e lipídico por meio de:

- Análise de glicemia de jejum;
- Quantificação de gordura peritoneal;
- Quantificação de colesterol total, triacilgliceróis, frações HDL-colesterol, LDL-colesterol e VLDL-colesterol no plasma;
- Determinação de lipídeos e colesterol totais hepáticos;
- Quantificação de ácidos biliares, colesterol total e lipídeos totais excretados nas fezes.

Investigar a ação fermentativa do óleo, farelo e linhaça triturada por meio de:

- Determinação do peso do conteúdo cecal;
- Análise de pH do conteúdo cecal;
- Quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta (acetato, butirato e propionato) no conteúdo cecal;
- Verificação do peso das fezes úmidas e dessecadas;
- Determinação das frações de fibras solúvel e insolúvel nas fezes.

4. Revisão da literatura

4.1 Linhaça (*Linum usitatissimum*)

A linhaça (*Linum usitatissimum*) é uma semente oleaginosa, proveniente de uma planta, pertencente à família das Lináceas, que apresenta um talo principal, da onde saem vários ramos nos quais nascem as folhas, as flores e as cápsulas. Tem aproveitamento pela indústria em quase sua totalidade. Seu caule é utilizado pela indústria para a produção do linho, tecido utilizado para a confecção de roupas. Da sua semente é extraído o óleo, utilizado para a fabricação de tintas, resinas e também na indústria alimentícia (TRUCOM, 2006).

No Brasil o cultivo da linhaça é mantido por descendentes de imigrantes poloneses e alemães, e se restringe basicamente ao Rio Grande do Sul, mais especificamente ao noroeste gaúcho, uma vez que é preciso clima frio, em torno de 0° até 2°C, para que ocorra a floração. Seu plantio ocorre no inverno e a colheita nos meses do verão. É de fácil cultivo, sendo muitas vezes realizado no processo de rotação das culturas, com a finalidade de recuperar terras e evitar o desgaste e a erosão do solo, aproveitando a adubação residual do milho e da soja (TRUCOM, 2006).

A linhaça possui 40% de peso em óleo, dos quais 70% são poliinsaturados (PUFAs). O ácido α -linolênico (ω -3) constitui mais de 50% desses lipídios. Assim, a linhaça é considerada o alimento de origem vegetal mais rico em ω -3, o que vem despertando o interesse em estudos sobre seus possíveis efeitos funcionais (DAUN et al, 2003; STAVRO et al, 2003). Além disso, é fonte de fibras alimentares, possui cerca de 30% de fibras, das quais 75% são insolúveis que atuam com efeito laxativo e 25%, solúveis cuja principal função é auxiliar na redução do colesterol plasmático (AHMED, 1999; PAYNE, 2000).

Contém cerca de 20% de proteínas, apresentando a lisina, a metionina e a cisteína como aminoácidos limitantes, 4% de cinzas e 6% de umidade. É

considerada um alimento de alta densidade energética (DAUN, et al., 2003; STAVRO, et al., 2003) fonte de vitamina E, vitaminas do complexo B e vitamina C, e possui como principais minerais o potássio e o fósforo (DAUN, et al., 2003).

Devido às características da sua composição, esse grão tem sido amplamente investigado e classificado como alimento com propriedade funcional (PAYNE, 2000; OOMAH, 2001; RAFTER, 2002).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamentou os alimentos funcionais por meio das Resoluções 18/99 e 19/99. Entre os pontos abordados, destaca-se que nenhum alimento comercializado possa fazer referência à cura ou à prevenção de doenças, sendo aceitos somente os termos “redução de risco” e “benefícios à saúde” (BRASIL, 1999a; BRASIL, 1999b).

Em vista disso, e de que esse grão pode ser consumido de diversas formas (*in natura*, inteiro ou moído), acrescentado diretamente sobre alimentos ou mesmo ser utilizado como ingrediente na preparação de diferentes produtos alimentícios, muitos estudos tem sido realizados com a linhaça ou com os produtos derivados da mesma como por exemplo, óleo, farelo e goma afim de investigar suas propriedades (VILLARROEL, et al., 2006).

A correlação entre ingestão da linhaça e redução do risco cardiovascular, pela redução do colesterol sanguíneo e da fração LDL (lipoproteína de baixa densidade) tem sido investigada. Os resultados evidenciaram que a linhaça possui componentes que auxiliam na redução do colesterol, como as fibras solúveis, ácidos graxos ω -3 e precursores das lignanas, as quais possuem grande potencial antioxidante (STAVRO, et al., 2003).

Vanharanta (1999) demonstrou associação inversa entre a concentração sérica de lignanas e o risco agudo de doença cardiovascular. Esse benefício foi atribuído não somente à presença de lignanas, mas em grande parte ao tipo e quantidade de fibras presentes na linhaça.

Bhathena (2003), comparando o efeito protetor da soja e da linhaça em modelo animal com hipertrigliceridemia e esteatose hepática, verificou redução tanto dos triacilgliceróis plasmáticos, quanto da fração LDL colesterol, com manutenção do HDL colesterol e menor deposição de lipídios no fígado do grupo com ingestão de linhaça.

Cintra et al. (2006) testaram o efeito do consumo de dieta hiperlipídica à base de óleo de soja, truta, semente de linhaça, amendoim e pele de frango, em ratos *Wistar*,

durante 28 dias. No grupo que ingeriu a linhaça, foi verificada a maior redução dos níveis de colesterol total e de triacilgliceróis, maior excreção fecal de lipídios e menor deposição de colesterol no fígado, resultado este comparável ao observado por Bhathena (2003).

Dessa forma, é comprovado que a ingestão da linhaça reduz os riscos de doença cardiovascular. Tais efeitos podem ser atribuídos a um conjunto de fatores, como fibras, lignanas e ácidos graxos ω -3, presentes na sua composição.

4.2 Propriedades das fibras de linhaça (*Linum usitatissimum*)

Várias definições vêm sendo, ao longo dos anos, propostas para definir fibras, no entanto ainda não existe um consenso entre as organizações internacionais a respeito do tema (DE VRIES e RADER, 2005).

No ano de 2000 a definição recomendada pela AACC (American Association of Cereal Chemists) estabelecida em comitê é a seguinte: “Fibra alimentar (FA) é a parte comestível de plantas ou carboidratos análogos que são resistentes à digestão e absorção no intestino delgado com fermentação completa ou parcial no intestino grosso. Fibra alimentar inclui polissacarídeos, oligossacarídeos, lignina, e substâncias vegetais associadas. Fibra alimentar promove efeitos fisiológicos benéficos incluindo laxativo e/ou atenuação de colesterol sanguíneo e/ou atenuação de glicemia” (AACC, 2000).

Em paralelo, também no ano de 2000, a Divisão de Alimentos e Nutrição do Instituto de Medicina (Institute of Medicine - IOM) da Academia Nacional norte americana formou um painel de discussão que propôs 2 definições para englobar os carboidratos não digeríveis. Em 2002 surgiu o termo “fibra funcional”, sendo assim, “fibra alimentar consiste de carboidratos não digeríveis e lignina que são intrínsecos e intactos em plantas; fibra funcional consiste de carboidratos não digeríveis isolados adicionados aos alimentos que exercem efeitos fisiológicos benéficos em humanos. Fibra total caracteriza-se pela fusão de fibra alimentar e fibra funcional” (DE VRIES e RADER, 2005; JONES, et al., 2006).

A fibra alimentar do grão de linhaça apresenta boa proporção entre fibra solúvel e insolúvel. A FA possui um papel fundamental na regulação da dinâmica do trânsito gastrointestinal e na formação e eliminação das fezes (RUIZ-ROSO, 2001), esse efeito é atribuído à fibra insolúvel, que tem capacidade de reter água o que contribui

para o aumento do volume fecal conseqüentemente diminuição do tempo de trânsito das fezes no trato intestinal. O efeito laxativo é atribuído a distensão das paredes do cólon, pelo aumento da massa fecal, que estimula os mecanorreceptores colônicos e os movimentos peristálticos do intestino (CAMPOS, 1999). Por outro lado, sabe-se que as fibras solúveis são em parte fermentadas pelas bactérias do cólon e que desempenham, no organismo, atividades hipoglicemiante, hipocolesterolêmica e hipotrigliceridêmica, além de atuarem na prevenção da obesidade, aumentando o poder de saciedade da refeição e ativando o metabolismo (RUIZ-ROSO, 2000; FILISETTI, 2007).

A goma ou mucilagem, por sua vez, é um polissacarídeo heterogêneo, formado por xilose, arabinose, glicose, galactose, ácido galacturônico e ramnose que compõe aproximadamente 8% do peso do grão e geralmente é extraída da torta de linhaça (CHEN, et al., 2006).

4.3 Efeitos de ácidos graxos de cadeia curta provenientes de linhaça (*Linum usitatissimum*)

Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são AG orgânicos com 1 a 6 carbonos que constituem os principais ânions do conteúdo colônico. Dos AGCC formados no cólon, 95% compreendem o acetato (2C), propionato (3C) e o butirato (4C), que são produzidos numa razão molar relativamente constante de 60:25:15, respectivamente (ROWE, 1992).

Os AGCC são produzidos a partir da degradação bacteriana de carboidratos e proteínas da dieta, sendo que os principais substratos fermentáveis do cólon são o amido e as fibras dietéticas (GÖNI, 2001).

Somente no final do século XX foram realizados estudos clínicos sobre a absorção e metabolismo envolvendo os AGCC (CAMPOS, 1999), esses estudos concluíram que a deficiência leve de AGCC determina inicialmente alterações funcionais (diminuição da absorção) que podem progredir para alterações morfológicas (hipoplasia) quando esta deficiência é mais intensa ou prolongada.

É sabido que os AGCC exercem papel fundamental na fisiologia normal do cólon, onde constituem a principal fonte de energia pra o colonócito, estimulam a proliferação celular do epitélio, o fluxo sanguíneo visceral e aumentam a absorção

de água e sódio da luz intestinal (SHEPPACH, 1992). Desta forma, os AGCC exercem efeitos tróficos sobre o intestino delgado e grosso.

A fermentação bacteriana tem efeitos metabólicos importantes na fisiologia colônica. (CAMPOS, 1999). A carga fermentável que chega ao cólon diariamente varia de 30 gramas (20 g de fibras/10 g de amido) a 80 gramas (40 g de fibras/40 g de amido) dependendo da quantidade e tipo de carboidrato na dieta. Esta carga produz, por meio da fermentação bacteriana, 300 a 800 mmol de AGCC nas fezes, capazes de formar 90 a 240 kcal, que representam 5 a 10% das necessidades energéticas totais do organismo. Mecanismo que talvez exerça um papel importante na manutenção do peso observada em alguns estudos.

Edralin (2002) observou que a ingestão de linhaça (40g/dia) por voluntários com menos de 65 anos, durante 3 meses, não promoveu alteração do peso. Porém, no grupo controle (consumo de dieta à base de trigo, 40g/dia) foi observado ganho de peso, o que sugere um efeito protetor da linhaça na manutenção do peso corporal. Os resultados do estudo de Dodin (2006) concordam com o citado anteriormente, neste estudo também foi ingerido 40g/dia de linhaça contra 40g/dia de germe de trigo porém o período de duração foi de 12 meses.

O mesmo efeito na manutenção do peso corporal foi verificado por Cintra (2006), quando comparou a ingestão da linhaça com amendoim, em ratos *Wistar*, neste estudo os animais foram divididos em grupos distintos para comparação da linhaça e do amendoim.

Os mecanismos pelos quais a linhaça pode atuar na manutenção do peso corporal requerem maiores investigações.

Especificamente em relação ao cólon, os AGCC constituem fonte fundamental de substrato energético, sendo que o butirato é reconhecido como a principal fonte de energia ao colonócito (NASSRI, 2008). Em ordem de preferência, os colonócitos metabolizam preferencialmente o butirato, propionato, acetato.

Em relação ao metabolismo nitrogenado, os AGCC diminuem a absorção de amônia (pela diminuição do pH), efeito com implicações importantes em pacientes com encefalopatia e insuficiência renal. A adição de fibras fermentáveis a dieta diminui a glicemia e a necessidade de insulina em diabéticos, por mecanismos relacionados a metabolitos dos AGCC. Outros efeitos incluem diminuição do colesterol sérico (propionato) e propriedade antibacterianas, prevenindo o

estabelecimento de bactérias patogênicas como espécies de *Salmonella* (ROYALL,1990).

5 Materiais e métodos

O experimento será executado no Laboratório de Grãos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel e no Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição, UFPel Pelotas/RS.

O presente estudo trata-se de um subprojeto do projeto Influência da linhaça (*Linum usitatissimum*) nos níveis de colesterol e na atividade antioxidante em ratos hipercolesterolêmicos. Este trabalho já possui aprovação pelo Comitê de Ética da UFPEL (processo 23110. 000472/2010-09 CEEA 0472) (Anexo 1). Serão tomadas todas as medidas necessárias para o bem-estar dos animais, conforme recomendação do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), descritas no Manual sobre Cuidado e Usos de Animais de Laboratório (NRC, 2003).

5.1 Materiais

5.1.1 Obtenção e pré-tratamento

5.1.1.1 Linhaça, farelo e óleo de linhaça

Os grãos de linhaça, espécie *Linum usitatissimum*, do tipo marrom, o farelo e o óleo serão provenientes, por doação, da Indústria de Óleos Vegetais Pazze Ltda (Panambi, RS, Brasil).

O farelo da linhaça será desengordurado com hexano na proporção 1:4 (m/v), homogeneizado e mantido em repouso por 24 horas, antes de ser filtrado em manta de algodão para retirada do solvente. Esse procedimento será repetido 6 vezes consecutivas. Para evaporação do excesso de solvente o farelo permanecerá em capela sob exaustão durante uma noite, posteriormente acondicionado em estufa ventilada a 40°C, durante 6 horas para total evaporação do solvente. O farelo seco e desengordurado será acondicionado em sacos plásticos e mantido sob refrigeração (8 a 10°C) até a elaboração das dietas.

5.1.2 Animais para experimentação

Serão utilizados ratos adultos, com 60 dias de idade, fêmeas (*Rattus*

norvegicus), da cepa *Wistar/UFPel*, pesando em média 200 a 300g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas/RS.

5.1.3 Ingredientes para as dietas

- Caseína pura (Synth)
- Amido de Milho (Comercial)
- Óleo de soja (Comercial)
- Fibra – hemicelulose (Microcel)
- Tetra-butilhidroquinona (Sigma)
- L-Cistina (Sigma)
- Bitartarato de colina (Sigma)
- Mix mineral (Formulado no laboratório com reagentes das marcas Sigma e Merck)
- Mix vitamínico (Farmácia de manipulação)
- Banha (Comercial)
- Colesterol (Sigma)
- Ácido cólico (Sigma)

5.2 Métodos

5.2.1 Ensaio Biológico

Será realizado ensaio biológico com 48 ratas fêmeas cepa *Wistar/UFPel*, divididas e distribuídas aleatoriamente em 8 grupos de 6 animais cada grupo, com dieta e água fornecidas *ad libitum*.

Os animais serão mantidos em gaiolas metabólicas individuais, com as seguintes características: medidas 27x19x20cm, produzida em arame de aço Inox Aisi 304 com polimento eletrostático, com pés de 35 cm de altura; comedouro tipo túnel e bebedouro de polipropileno com capacidade para 300 mL, rolha de borracha anti-ácida e bico de aço inoxidável curvo, além de funil para recepção das fezes e becker para coleta de urina (Modelo MA122 - Marca Beiramar).

Os animais serão mantidos no Laboratório de Ensaio Biológicos da Faculdade de Nutrição da UFPel, com temperatura e umidade relativa de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e 50 - 60%, respectivamente, com ciclo claro/escuro de 12 horas. O estudo terá duração de 54 dias, sendo 4 dias de adaptação e 50 dias de tratamento.

Serão coletas fezes por dois períodos distintos e armazenadas em freezer comum.

Ao final do experimento, após jejum de 12 horas, os animais serão submetidos à eutanásia por decapitação para a retirada do fígado, gordura peritoneal, ceco e conteúdo cecal.

As amostras de sangue serão coletadas em tubos de ensaio e centrifugadas a 3500rpm, à temperatura ambiente, por 10 minutos, sendo o plasma separado e armazenado a -18°C, até análise das frações lipídicas (DONGOWSKI, et al.; 2002). A medição da glicemia será realizada em glicosímetro Advantage Roche®, utilizando uma gota de sangue coletado em seguida da eutanásia.

Os animais serão laparotomizados para a coleta do fígado, sendo este lavado com soro fisiológico e seco com gaze. O fígado será pesado e separado em três partes, das quais duas serão congeladas separadamente, sendo uma para a quantificação dos lipídeos hepáticos e outra para análise histológica. O órgão será mantido a -80°C (ultralow freezer-Nuire Inc, MN, USA). Uma terceira parte será armazenada em formol 10% para análises histológicas posteriores.

Os cecos completos (com conteúdo) serão delimitados e pesados. Na sequência, o pH do conteúdo do ceco será aferido por meio de uma pequena incisão na parede do órgão, onde será introduzido eletrodo portátil de calibre de 5mm de diâmetro. O conteúdo do ceco será então coletado em tubos tipo Falcon e imediatamente congelado a -80°C para posterior quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta. Os cecos serão então lavados com soro fisiológico, secos cuidadosamente com gaze e pesados. Em seguida serão identificados e armazenados por imersão em formol 10%, mantidos à temperatura ambiente para futuras análises histológicas (KIM, et al., 1998; ADAM, et al., 2001; DONGOWSKI, et al., 2002).

Todo o material biológico não utilizado no experimento será descartado segundo as Normas de Segurança Laboratorial.

5.2.2 Dietas

5.2.2.1 Composição centesimal da linhaça e farelo desengordurado

A composição centesimal será determinada em amostras da linhaça e do farelo desengordurado segundo os respectivos procedimentos recomendados pela

Association of Official Analytical Chemistry (1995), sendo a determinação de carboidratos realizada segundo Dubois, 1956 e comparada com o cálculo do conteúdo de carboidratos obtido pela diferença entre 100% e a soma dos demais macronutrientes. A análise centesimal determinará os teores de proteína, umidade e cinzas, segundo os procedimentos descritos no manual da AOCS. Lipídios totais serão determinados pelo método descrito por Bligh & Dyer (1959).

5.2.2.2 Preparo das dietas experimentais

A partir da composição centesimal das matérias-primas, serão formuladas as dietas, conforme apresentado na Tabela 1. Todas as dietas serão preparadas no Laboratório de Nutrição Experimental – UFPel, seguindo o padrão dietético do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93M) segundo Reeves et. al. (1993). As dietas experimentais serão preparadas previamente e armazenadas sob congelamento a -20°C em embalagens de polietileno.

Os animais serão alimentados com dieta padrão (AIN-93M) e controle hiperlipídica, modificando-se o teor de lipídeos de 4% para 25%, adicionando-se colesterol (1%) e ácido cólico (0,1%) (ROSA et al., 1998), semente de linhaça triturada (7,5% e 15%), farelo resultante das concentrações 7,5% e 15 % e óleo da semente de linhaça nas concentrações 4% e 8% (concentração recomendada e dobro).

TABELA 1. Formulação das dietas experimentais.

Ingredientes (g)	Dietas (g)							
	N (P)	HL (C)	HL (L7,5%)	HL (L15%)	HL (F7,5%)	HL (F15%)	HL (O4%)	HL (O8%)
Sacarose	100	100	100	100	100	100	100	100
Amido de milho	465,472	232,472	217,592	202,802	210,162	184,812	232,472	232,472
Caseína	152,22	152,22	137,2	122,1	126,33	100,45	152,22	152,22
Amido dextrinizado	155	155	155	155	155	155	155	155
Óleo de soja	40	-	-	-	-	-	-	-
Fibra	50	50	31,58	13,16	23,49	-	50	50
Mix mineral	35	35	35	35	35	35	35	35
Mix vitamínico	10	10	10	10	10	10	10	10
L-cistina	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Tetra butilhidroquinona	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008
Banha suína	-	250	223,32	196,63	249,71	249,43	210	170
Colesterol	-	10	10	10	10	10	10	10
Ácido cólico	-	1	1	1	1	1	1	1
Linhaça triturada	-	-	75	150	-	-	-	-
Farelo desengordurado	-	-	-	-	75	150	-	-
Óleo de linhaça	-	-	-	-	-	-	40	80
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

N: Dieta Normal; - **P:** Grupo Padrão; **HL:** Dietas Hiperlipídica; - **C:** Grupo Controle; - **L7,5%:** Grupo 7,5% Linhaça; - **L15%:** Grupo 15% Linhaça; - **F7,5%:** Grupo Farelo 7,5%; - **F15%:** Grupo Farelo 15%; - **O4%:** Grupo óleo 4%; - **O8%:** Grupo Óleo 8%.

5.2.3 Delineamento experimental

O experimento constará de 48 animais resultantes do delineamento experimental inteiramente casualizado entre 8 grupos com 6 repetições (dieta x rato = 48), avaliando-se o consumo de dieta, ganho de peso, excreção fecal, lipídios fecais e hepáticos, colesterol total e frações, ação fermentativa da linhaça, totalizando 912 determinações, conforme Tabela 2.

TABELA 2. Delineamento experimental para avaliar a influência da linhaça em dietas hiperlipídicas nos parâmetros fermentativos e no metabolismo lipídico de ratos.

Tratamentos	Variáveis Independentes				Variáveis Dependentes
	Linhaça	Óleo	Farelo	Dieta	Avaliações
1 Padrão	0	0	0	N**	Variáveis a serem analisadas:
2 Controle	0	0	0	H***	Gordura peritoneal
3 Linhaça	7,5%	0	0	H	Fígado = peso, colesterol e lipídeos totais
4 Linhaça	15%	0	0	H	Plasma = ct e frações, triacilgliceróis
5 Óleo	0	4%	0	H	Fezes = colesterol, lipídeos e ácidos biliares
6 Óleo	0	8%	0	H	Massa fecal úmida e dessecada
7 Farelo	0	0	7,5%	H	Peso do ceco
8 Farelo	0	0	15%	H	Ácidos graxos no conteúdo do ceco pH do conteúdo do ceco Consumo de dieta Ganho de peso

*CT: Colesterol total; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; HDL: Lipoproteína de alta densidade; VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade; TAG: Triacilgliceróis

8 dietas experimentais = 8 tratamentos x 6 ratos = 48 amostras x 21 avaliações = 1008 determinações. ** N - **Dieta Normal:** dieta padrão (AIN-93M); *** H - **Dieta Hiperlipídica:** 25% de teor lipídico, colesterol (1%), ácido cólico (0,1%).

Serão avaliadas dietas com adição de 7,5% e 15% de linhaça triturada, hiperlipídicas, dietas adicionadas do farelo desengordurado e dietas adicionadas com o óleo de linhaça (4 e 8%), sendo comparadas à dieta controle hiperlipídica (AIN-93M).

5.2.4 Avaliações

5.2.4.1 Composição centesimal

A composição centesimal será determinada na matéria-prima e em amostras das dietas experimentais conforme descrito no item 5.2.2.1.

5.2.4.2 Avaliação do perfil de ácidos graxos

Será identificado e quantificado o perfil de ácidos graxos do óleo de linhaça, farelo de linhaça e na linhaça triturada, segundo a AOCS, 1992. Os lipídios totais serão submetidos ao processo de transesterificação para a preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos. Os ésteres de ácidos graxos serão analisados por

cromatografia gasosa, modelo Shimadzu 17A, equipado com split e detector de ionização de chama (FID), coluna capilar de 30m x 0,25mm x 0,2µm de cyanopropyl phenyl-bicyanopropyl polysiloxane de fase. A temperatura programada será de 100°C por 0,5 minutos, seguindo a 180°C com incremento linear de 1,5°C/min, mantida por 5 minutos e finalmente a 220°C com incremento linear de 2°C/min, mantida por 6 minutos, com tempo total de corrida de 58,25 minutos. O injetor e o detector devem estar a 250°C.

5.2.4.3 Ganho de peso, consumo de dieta e peso fecal

Os animais serão pesados no início e a cada dez dias até o término do experimento. O consumo de dieta será o somatório de avaliações diárias entre a dieta fornecida e a consumida durante o experimento. As fezes serão recolhidas em dois períodos do experimento por 10 dias consecutivos cada, pesadas e armazenadas sob congelamento em sacos de polietileno e ao final do experimento serão analisadas.

5.2.4.4 Perfil lipídico

As frações plasmáticas de colesterol total, triacilgliceróis e HDL-colesterol serão determinadas utilizando *kits* enzimáticos comerciais.

O sangue coletado será centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos para se obter o plasma sangüíneo, que será transferido para Eppendorfs e congelado a -20°C até o momento das análises. O colesterol total sérico será quantificado por sistema enzimático Labtest Diagnóstica® colesterol liquiform cat. 76-2/100.

O colesterol HDL será determinado através da precipitação das lipoproteínas de baixa densidade e de muito baixa densidade (c-LDL e c-VLDL), utilizando o sistema enzimático Labtest Diagnóstica® colesterol liquiform cat. 13. O VLDL será calculado pela fórmula de $VLDL = \text{Triacilglicerol}/5$ e o LDL pela diferença entre colesterol total (CT) e (HDL + VLDL) $LDL = [CT - (HDL + VLDL)]$ (FRIEDWALD et al., 1972).

Os triacilgliceróis serão determinados pelo sistema enzimático Labtest Diagnóstica® (GPO-ANA cat. 59-4/50).

5.2.4.5 Lipídios hepáticos

Para a análise dos lipídios hepáticos as amostras dos fígados dos animais serão maceradas, utilizando-se uma alíquota de fígado de cada animal do grupo. Será utilizado o método de Bligh e Dyer (1959) para extração dos lipídios totais.

5.2.4.6 Umidade e lipídios fecais

Ao final do experimento, as fezes armazenadas congeladas serão transferidas para placas de petry e levadas à estufa (50°C) até peso constante, para avaliação da umidade. Após a desumidificação, as amostras de fezes serão maceradas e analisadas quanto ao teor de lipídeos totais de acordo com método de Bligh e Dyer (1959).

5.2.4.7 Fibras nas fezes

Para a análise de fibra alimentar (solúvel e insolúvel) será utilizado o método recomendado pela AOAC, 1999 (Total, Soluble and Insoluble Dietary Fiber in Foods).

5.2.4.8 Determinação de ácidos biliares nas fezes

Os ácidos biliares serão extraídos das fezes dessecadas segundo Van der MEER et al. (1985) com a utilização de tert-butanol a 50% por 15 minutos a 37°C, seguido de centrifugação a 10.000g por 2 minutos.

A quantificação será realizada por meio de *kit* enzimático colorimétrico. Na presença de Tio-NAD, a enzima 3- α hidroxisteróide desidrogenase (3- α HSD) converte os ácidos biliares a 3-ceto-esteróides eTio-NADH. A taxa de formação de Tio-NADH é determinada pela mudança de absorbância a 405nm, mensurada entre 60 e 120 segundos de reação. A leitura será realizada em Espectrofotômetro UV-Visível.

As determinações serão realizadas em triplicata.

5.2.4.9 Quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta

A extração dos AGCC no conteúdo do ceco será realizada segundo ZHAO e col. (2005), com algumas modificações. Meio grama de conteúdo do ceco será suspenso em 5 mL de água e homogeneizado por 3 minutos. O pH da suspensão cecal será

ajustado entre 2 e 3 pela adição de solução de HCl 5M. Esta suspensão será então transferida para tubos de polipropileno e centrifugada por 20 minutos a 5000 rpm, obtendo-se um sobrenadante limpo que será injetado em cromatógrafo gasoso para quantificação dos AGCC.

Será utilizado cromatógrafo gasoso modelo GC-2010 (Shimadzu Scientific Instruments Inc, Japan) e coluna capilar de sílica Nukol, com dimensões de 30 cm, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura de filme (Supelco, USA). Como gás de arraste será utilizado hidrogênio ao fluxo de 1,8 mL/min. A temperatura inicial do forno será de 100°C mantida por 0,5 minutos, seguida com taxa de aumento de 8°C/min até 180°C, mantida por 1,0 minutos, seguindo-se taxa de aumento de 20°C/min até 200°C, sendo mantido nesta temperatura por 5 minutos. A temperatura do detector de chama (FID) e injetor serão de 240°C e 200°C respectivamente, e o volume de injeção de 1 μ L, com split de 1:2 (AOAC, 1992; ZAMBIAZI, 1997).

Para identificação será utilizada comparação do tempo de retenção utilizando como padrão externo mistura de ácidos graxos de cadeia curta livres (Volatile free acid mix, Cód. 46975, sigma Aldrich, USA). A quantificação será realizada através da curva padrão nas concentrações de 2 a 10 mM.

As determinações serão realizadas em triplicatas.

6 Análise estatística

Será utilizada a análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey, quando indicado, considerando como nível de significância estatística, o limite de 5% (Statistica versão 7.0).

7 Cronograma de atividades

ATIVIDADES	1º ANO		2º ANO	
	1º sem.	2º sem.	1º sem.	2º sem.
Revisão bibliográfica				
Ensaio preliminares				
Determinações químicas				
Ensaio biológico				
Determinações bioquímicas				
Processamento de dados				
Divulgação dos resultados				

8 Referências

AACC. **Cereal Foods World**, v.46, n.3, p.112-129, 2001.

ADAM, A.; LEVRAT-VERNY, M. A.; LOPEZ, H. W.; LEUILLET, M.; DEMIGNÉ, C.; RÉMESY, C. Whole wheat and triticale flours with differig viscosities stimulate cecal fermentations and lower plasma and hepatic lipids in rats. **Journal of Nutrion**, v.131, n.6, p.1770-1776, 2001.

AHMED, Z.S. Physico-chemical, structural and sensory quality of corn-based flaxsnack. **Nahrung** v.43, n. 4, p.253-258, 1999.

ALMARIO, R. U.; VONGHAVARAVAT, V.; WONG. R.; KARAKAS, S. E. K. Effects of walnut consumption on plasma fatty acids and lipoproteins in combined hyperlipidemia. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.74, n.1, p.72-79, 2001.

AOCS. American Oil Chemists' Society. Official and tentative methods of the Americans Olis Chemist's Society, Champaign, IL., 1992.

AOAC INTERNATIONAL. Total, Soluble and Insoluble Dietary in Foods: Method 991,43- First action 1991- Final Action 1994 In: Official Methods of Analysis of AOAC International, 16^a ed., 5^a rev. Gaithersburg, c 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis. 16th ed. Washington, DC; 1995.

BHATHENA S.J.; ALI, A.A; HAUDENSCHILD, C.; LATHAM, P.; RANICH, T.; MOHAMED, A. I.; HANSEN, C. T.; VELASQUEZ, M. T. Dietary flaxseed meal is more protective then soy concentrate against hypertriglyceride and steatosis of the liver in animal modelo f obesity. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 22, n.2, p. 157-64, 2003.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 1959.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução n. 18*, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília, 1999a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução n. 19*, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. Brasília, 1999b.

CAMPOS, F. G.; HABR-GAMA, A.; PLOPPER, C.; TERRA, R. M.; WAITZBERG, D. L. Ácidos graxos de cadeia curta e doenças colorretias. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 19, n. 1, p. 11-16, 1999.

CHEN, H-H; XU, S-Y; WANG, Z. Interaction between flaxseed gum and meat protein. **Journal of Food Engineering**. v. 80, n.4, p 1051-1059, 2007.

CINTRA, D. E. C.; COSTA, A. G. V.; PENUZIO, M. C. G.; MATTA, S. L. P.; SILVA, M. T.; COSTA, N. M. B. Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout or chicken skin. **Nutrition**, v.22, n.2, p.197-205, 2006.

COLLINS, T. F. X.; SPRANDO, R. L.; BLACK, T. N.; OLEJNIK, N.; WIESENFELD, P. W.; BABU, U. S.; BRYANT, M.; FLYNN, T. J.; RUGGLES, D. I. Effects of flaxseed and defatted flaxseed meal on reproduction and development in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.41, n.6, p.819–834, 2003.

COOK, S. I.; SELLIN, J. H. Review article: short-chain fatty acids in health and disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**. v.12, n.6, p 499-507, 1998.

DAUN, J. K.; BARTHET, V. J.; CHORNICK, T. L.; DUGUID, S. Structure, composition, and variety development of flaxseed. In: THOMPSON, L .U.; CUNNANE, S. C. Flaxseed in Human Nutrition. AOCS PRESS, 2.ed., p. 1-40, 2003.

DE VRIES, J.W.; RADER, J.I. Historical perspective as a guide for identifying and developing applicable methods for dietary fiber. **Journal of AOAC International** v. 88, n.5, p.1349-1366, 2005.

DODIN, S.; LEMAY, A.; JACQUES, H.; LÉGARÉ, F.; FOREST, C.; MÂSSE, A. The effects of flaxseed dietary supplement on lipid profile, bone mineral density, and symptoms in menopausal women: A randomized, double – blind, wheat germ placebocontrolled clinical trial. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v.90, n.3, p.1390-1397, 2006.

DONGOWSKI, G.; HUTH, M.; GEBHARDT, E.; FLAMME, W. Dietary fiber-rich barley products beneficially affect the intestinal tract of rats. **Journal of Nutrition**, v.132, n.12, p.3704-3714, 2002.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**. v. 3, n. 3, 1956.

EDRALIN, A. R.; WILD, R. D.; HAMMOND, L. J.; KHALIL, D.A; JUMA, S.; DAGGY, B. P.; STOECKER, B. J.; ARJMANDI, B. A. Flaxseed improves lipid profile without altering biomarkers of bone metabolism in postmenopausal women. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 4, p. 1527- 1532, 2002.

FAO/WHO Food and Agriculture Organization/ World Health Organization. Carbohydrates in human nutrition. Report of a join FAO/WHO expert consultation. 66. Rome 1998.

FILISSETTI, T. M. C. C., LOBO, A. R. Fibra alimentar e seu efeito na biodisponibilidade de minerais. In: Cozzolino, SMF. Biodisponibilidade de nutrientes. 2ª ed. Barueri: Manole Ltda; 2007.

FRIEDWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v.18, p.499-502, 1972.

GÖNI I, Martín-Carrón N, Fermentación colónica de fibra dietética y almidón resistente. In Lajolo FM, Saura-Calixto F, Penna E W, Menezes E W. **Fibra dietética em iberoamérica: tecnologia e salud: obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela; 2001. P 311-38.

GRECA, F. H.; SIMÕES, M.de L. P. B.; MARTINS, V.D.M.; ARAÚJO, F. H. de; MILANO, J. B. Os ácidos graxos de cadeia curta na cicatrização de anastomoses colônicas: estudo experimental em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. v. 30, n.4, p.268-274, 2003.

JONES, J.R.; LINEBACK, D.M.; LEVINE, M.J. Dietary reference intakes: implications for fiber labelin and consumption: a summmary of the International Life Sciences Institute North America fiber workshop, june 1-2, 2004, Washington, DC. **Nutrition Reviews**, v.64, n.1, p.31-38, 2006.

KIM, M.; SHIN,H. K. The Water-Soluble Extract of Chicory Influences Serum and Liver Lipid Concentrations, Cecal Short-Chain Fatty Acid Concentrations and Fecal Lipid Excretion in Rats. **Journal of Nutrition**, v.128, n.10, p.1731-1736, 1998.

LIMA, F. E. L.; MENEZES, T. N.; TAVARES, M. P.; SZAFARC, S. C.; FISBERG, R. M. Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. **Revista de Nutrição, Campinas**, v.13, n.2, p.73-80, 2000.

MARQUES, Anne. **Propriedades funcionais da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) em diferentes condições de preparo e de uso em alimentos**. 2008. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de

Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

MATIAS, Andrea C. G. **Avaliação de efeitos fisiológicos da fração fibra alimentar dos grãos de amaranto (*Amaranthus cruentus* L.) e linhaça (*Linum usitatissimum* L.)**. 2007. 111p. Tese (Doutorado em Saúde Pública)-Faculdade de Nutrição, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MORRIS, D. H. Essential nutrients and other functional compounds in flaxseed. **Nutrition Today**, v. 33, n.3, p.159, 2001.

NASSRI, C. G. G.; NASSRI, A. B.; FAVERO, E.; ROTTA, C. M.; MARTINEZ, C. A. R.; MARGARIDO, N. F. Influência da Irrigação de Soluções Nutricionais no Colo Excluído de Trânsito Intestinal. Estudo Experimental em Ratos. **Revista brasileira de Coloproctologia**, v.28, n.3, p.306-314, 2008.

OOMAH, B.D. Flaxseed as a functional food source. **Journal of Science Food and Agriculture**, v.81, p.889-894, 2001.

PAYNE, T.J. Promoting Better Health with Flaxseed in Bread. **Cereal Foods World**, v.45, n.3, 2000.

RAFTER, J.J. Scientific basis of biomarkers and benefits of functional foods for reduction of disease risk: cancer. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 2, p.219-224, 2002.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR., G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee and the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993.

RIEDIGER, N.D.; AZORDEGAN, N.; JANZ, S. H.; MA, D. W. L.; SUH, M.; MOGHADASIAN, M. H. Designer oils' low in n-6:n-3 fatty acid ratio beneficially modifies cardiovascular risks in mice. **European Journal of Nutrition**, v.48, p. 307-314, 2009.

ROSA, C. O. B; COSTA, N. M. B; NUMES, R. M. Efeito dos feijões (*Phaseolus vulgaris*, L.) preto, carioca e vermelho na redução de colesterol sanguíneo de ratos hipercolesterolêmicos. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. v.48, n.4, p.306-310, 1998.

ROWE, W. A.; BAYLESS, T. M. **Gastroenterology**. v.103, p. 306-339, 1992.

ROYALL, D.; WOLEVER, T. M. S.; JEEJEEBHOY, K. Clinical significance of colonic fermentation. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 85, p. 1307-12, 1990.

RUIZ-ROSO, B., PÉRES-OLLEROS, L., GARCÍA-CUEVAS, M. Influencia de la fibra dietária (FD) en la biodisponibilidad de los nutrientes. In: Lajolo FM, Calixto FS, Penna EW, Menezes EW. Fibra dietética en iberoamérica: tecnología y salud. São Paulo: Varela Ltda; 2001.

WHO (WHORLD HEALTH ORGANIZATION). 2008-2013 Action Plan for the Global Strategy for the Prevention and Control of Noncommunicable Diseases. p.7, 2008.

SALES, Rejane L. de. **Efeitos do amendoim e da linhaça no perfil lipídico, composição corporal e processo inflamatório em indivíduos com excesso de peso**. 2009. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerias.

STAVRO, P. M.; MARCHIE, A. L., KENDALL, C. W. C.; VUKSAN, V.; JENKINS, D. J. Flaxseed, Fiber, and Coronary Heart Disease: Clinical Studies. In: THOMPSON, L. U.; CUNNANE, S. C. Flaxseed in Human Nutrition. AOCSS PRESS, 2.ed., p. 288-300, 2003.

SHEPPACH, W.; BARTRAN, P.; RICHER, F.; LIEPOLD, H.; DUSEL, G.; RUTHLEIN, J.; KASPER, H. Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 16, p. 43-48, 1992.

TRUCOM, Conceição. A importância da linhaça na saúde. 1.ed. São Paulo: Alaúde; 2006. 152p.

TODESCO, T.; RAO, A. V.; BOSELLO, O.; JENKINS, D. J. A. Propionate lowers blood glucose alters lipid metabolism in health subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.54, p.860, 1991.

VAN DER MEER, R.; VRIES, H.; GLATZ, F. C. T butanol extraction of feces: a rapid procedure for enzymic determination of fecal bile acids. In: Beyben AC, Geeleb MJH, Katan MB, Schoyten JA. **Cholesterol metabolism in health and disease: studies in the Netherlands**. Wageningen: Ponsen & Looijen; 1985. p 113-19.

VANHARANTA, M.; VOUTILAINEN, S.; LAKKA, T.; VAN DER LEE, M.; ADLERCREUTZ, H.; SALONEN, J. Risk of acute coronary events according to serum concentrations of enterolactone: a prospective population-based case-control study. **The Lancet**, v.354, n. 9196, p. 2112-2115, 1999.

VILLARROEL, M.; PINO, L.; HAZBUN, J. Desarrollo de una Formulación Optimizada de Mousse de Linaza (Linum Usitatissimum). **Archivos Latinoamericanos de Nutrição**, v.56, n.2, p.185-191, 2006.

ZAMBIAZI, R. C. The oil of endogenous lipid components on vegetable oil stability. Tese de doutorado. p. 304. Foods and nutritional science interdepartmental program. University of Manitoba, Winipeg, Manitoba-Canada, april, 1997.

ZHAO, G., NYMAN, M.; JONSSON, J. A. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. **Biomedical chromatography**, v.20, p. 674-682, 2006.

Anexo 1

Alterações no projeto de pesquisa

O método de extração e as condições da corrida no CG para a análise de identificação e quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta foi modificado.

A extração dos ácidos graxos de cadeia curta foi feita segundo Zambiasi (1997) ao invés da metodologia proposta por Zhao et al. (2005).

As análises histológicas previstas para o fígado não foram realizadas.