

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Departamento de Biologia Animal



**Alimentos funcionais com microalgas: nova fonte
de pigmentos, antioxidantes e ácidos gordos
ómega 3**

Diana Rita da Silva Duarte nº 32343

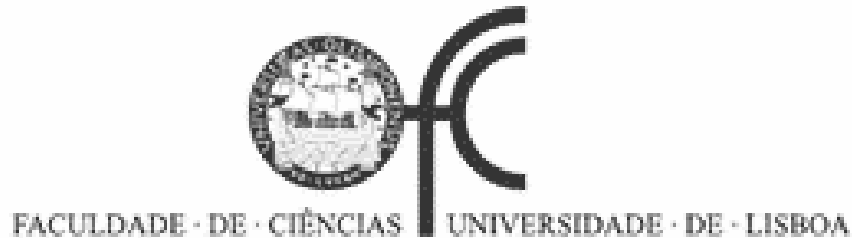
Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2010

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Departamento de Biologia Animal



**Alimentos funcionais com microalgas: nova fonte
de pigmentos, antioxidantes e ácidos gordos
ómega 3**

Dissertação de Mestrado orientada pela Professora Doutora Ana Maria Viegas-Crespo (FCUL) e pela Doutora Narcisa Maria Mestre Bandarra (INRB, I. P./ L-IPIMAR)

Diana Rita da Silva Duarte n° 32343

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2010

O trabalho apresentado nesta tese foi realizado no Laboratório de Investigação das Pescas e do Mar, do Instituto Nacional de Recursos Biológicos (INRB, I.P./L- IPIMAR) e nos laboratórios da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (FFUL).

AGRADECIMENTOS

Agradeço desde já a todos os que durante a realização desta tese de mestrado me apoiaram, e tornaram o tempo nela dispendido satisfatório e valioso a nível académico e pessoal.

À Doutora Narcisa Bandarra, Investigadora Auxiliar do Instituto de Investigação das Pescas e do Mar (INRB, I.P./L-IPIMAR), pela orientação prestada, pelos conhecimentos científicos que me transmitiu, pela boa-disposição e agrado com que sempre me tratou, por toda a ajuda, apoio, paciência e confiança em mim depositada, o meu profundo agradecimento.

À Professora Doutora Ana Maria Viegas-Crespo, pertencente à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), por me ter possibilitado a realização desta tese, pelas dicas que me foi fornecendo para o melhoramento da tese e pelo apoio e constante disponibilidade, o meu profundo agradecimento.

À Eng.^a Maria Leonor Nunes, directora do Departamento de Inovação Tecnológica e Valorização dos Produtos da Pesca (U-VPPA) pela disponibilidade.

Às colegas de laboratório da Unidade de Lípidos, e não só: Joana Coutinho, Maria do Castelo, Mária Padilha, Carlos Cardoso, Júlia Ferreira, Cristina Ramos, Mafalda Pereira, Patrícia Anacleto e Bárbara Teixeira, pelo companheirismo e ajuda prestada.

Aos membros do DITVPP-IPIMAR/LNRB-IP pelo apoio técnico e laboratoriais concedidos ao longo deste trabalho experimental, em especial ao Doutor Rogério Mendes.

À Doutora Cristina Sampayo, Doutor Rui Pinto e à Doutora Beatriz Silva-Lima, pertencentes à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (FFUL), pelo apoio, simpatia e por todos os conhecimentos que me transmitiram.

À Joana Lucas, colega de laboratório na FFUL, um grande obrigado.

À minha família e amigos pelo constante apoio, palavras de incentivo e especialmente pela constante amizade ao longo destes anos. Um agradecimento especial à minha irmã e a Ana e a todos os meus amigos que de certo modo estiveram mais envolvidos nesta fase difícil da minha vida. O vosso constante apoio foi imprescindível para a realização desta tese.

Aos meus pais, por todo o investimento na minha formação académica, e por todo o apoio que sempre me deram. A vocês dedico este trabalho.

GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS

As abreviaturas utilizadas ao longo do texto encontram-se aqui por ordem alfabética, seguida da correspondente definição. As abreviaturas foram introduzidas e explicadas entre parênteses à medida que vão surgindo no texto. Estas foram mantidas de acordo como são reconhecidas internacionalmente, sendo incluída a tradução mais próxima para a língua portuguesa.

AA- Ácido 5,8,11,14- Eicosatetraenóico, Ácido araquidónico, 20:4n-6

ACE- Enzima conversor da angiotensina

ADN- Ácido Desoxirribonucleico

ALA- Ácido α -Linolénico, 18:3n-3

ALT- Alanina Aminotransferase

AMP- Adenosina Monofosfato

AST- Aspartato Aminotransferase

ATP- Adenosina Trifosfato

AVC- Acidente Cardiovascular

C- Carbono

CHD- Doença coronária

Cl- Cloro

CVD- Doença Cardiovascular

CRP- Proteína C reactiva

DHA- Ácido 4,7,10,13,16,19- Docosaheptaenóico, 22:3n-6

DDR- Dose Diária Recomendada

EFA- Ácidos Gordos Essenciais

EPA- Ácido 5,8,11,14,17- Eicosapentaenóico, 20:5n-3

EUA- Estados Unidos da América

EVM- *Expert Group on Vitamins and Minerals*

FABP- Proteína ligante de ácidos gordos

FAME- Ésteres Metílicos dos Ácidos Gordos

FDA- *Food and Drug Administration*

FFA- Ácido Gordo Livre

FNB- *Food and Nutrition Board*

FSA- *Food Standards Agency*

CG - FID- Cromatografia Gás-Líquido com detector de Ionização de Chama

GISSI- Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell' Infarto miocardico

H- Hidrogénio

HCIO- Ácido Hipocloroso

HDL- Lipoproteínas de Alta Densidade

HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Pressão

Índice Ômega-3- EPA+ DHA na Membrana dos Eritrócitos

ILSI- *International Life Science Institute*

ISSFAL- *The International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids*

LA- Ácido Linoléico, 18:2n-6

LDL- Lipoproteínas de Baixa Densidade

MDA- Malonaldeído

MG- Monoglicérido

MI- Miocárdio

MPO- Mieloperoxidase

MUFA- Ácidos Gordos Monoinsaturados

NO- Óxido Nitrico

NEFA- Ácidos Gordos Não Esterificados

NADPH- Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

O- Oxigénio

OMS- *Organização Mundial de Saúde*

PC- Fosfatidilcolina

PL- Fosfolípidos

PLA- Lipase Pancreática

PPAR- Proliferador de peroxissoma

PUFA n-3- Ácidos Gordos Polinsaturados da Família Ómega-3

PUFA n-6- Ácidos Gordos Polinsaturados da Família Ómega-6

RAS- Sistema Regina e Angiotensina

ROS- Espécies Reactivas de Oxigénio

SM- Esfingomiéline

TAG- Triacilglicerol

VLDL- Lipoproteínas de Densidade Muito Baixa

UV- Ultra-violeta

Índice

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1.INTRODUÇÃO	1
1.1. Alimentos funcionais - aspectos gerais	1
1.1.1. Microalgas como ingredientes funcionais	2
1.2. Microalgas como fonte de PUFA n-3	3
1.2.1. Ácidos Gordos, propriedades gerais.....	4
1.2.2. Digestão, Absorção e Transporte dos ácidos gordos.....	7
1.2.3. Benefícios da incorporação de ácidos gordos n-3 na dieta.....	10
1.2.4. Desvantagens associadas ao consumo de ácidos gordos PUFA n-3	14
1.2.5. Perfil lipídico da microalga <i>Diacronema vlkianum</i>	15
1.3. Microalgas como fonte de carotenóides.....	15
1.3.1. Carotenóides, propriedades gerais.....	16
1.3.2. Digestão, Absorção e Transporte de carotenóides	18
1.3.3. Benefícios da incorporação de carotenóides na dieta.....	20
1.3.4. Desvantagens associadas ao consumo de carotenóides.....	24
1.3.5. Perfil da <i>Chlorella vulgaris</i> em carotenóides.....	25
2. OBJECTIVOS	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1. Delineamento, material e características gerais do estudo	28
3.2. Delineamento do estudo da suplementação com <i>Diacronema vlkianum</i>	28
3.2.1. Extracção de ácidos gordos nas amostras recolhidas do estudo com suplementação em <i>Diacronema vlkianum</i>	29
3.2.2. Análise da presença de ácidos gordos nas amostras por GC-FID	30
3.3. Delineamento do estudo com suplementação em <i>Chlorella vulgaris</i> na variante laranja	32
3.3.1. Determinação dos carotenóides totais na <i>Chlorella vulgaris</i> na sua variante laranja	32
3.3.2. Extracção de carotenóides nas amostras recolhidas no estudo com suplementação de <i>Chlorella vulgaris</i> na sua variante laranja	33

3.3.3. Análise da presença de carotenóides nas amostras por HPLC	33
3.4. Análise estatística	34
4. RESULTADOS	36
4.1. Perfil percentual dos ácidos gordos da <i>Diacronema vlkianum</i> e da ração	36
4.2. Determinação dos ácidos gordos dos órgãos e tecidos analisados	37
4.2.1. Composição percentual de ácidos gordos dos Eritrócitos	37
4.2.2. Composição percentual de ácidos gordos do Fígado	39
4.2.3. Composição percentual de ácidos gordos do Coração	40
4.2.4. Composição percentual de ácidos gordos do Rim.....	42
4.2.5. Composição percentual de ácidos gordos da Gordura Subcutânea	43
4.2.6. Composição percentual de ácidos gordos da Gordura Visceral	45
4.2.7. Comparação dos níveis de EPA, DPA e DHA nos diferentes órgãos e tecidos	47
4.2.8. Composição percentual de ácidos gordos da Análise Fecal.....	48
4.3. Optimização da metodologia (HPLC).....	49
4.3.1 Limites de Detecção e Quantificação dos diferentes padrões	49
4.3.2 Tempos de retenção dos diferentes padrões.....	50
4.3.3. Perfil de carotenóides da <i>Chlorella vulgaris</i> e da ração.....	50
4.3.4. Análise da presença de carotenóides nos órgãos e tecidos recolhidos	51
4.3.5. Análise da presença de carotenóides nas amostras fecais	52
5. DISCUSSÃO DE RESULTADOS	53
5.1. Análise de ácidos gordos na microalga <i>Diacronema vlkianum</i> e na ração	53
5.2. Determinação dos ácidos gordos nos órgãos e tecidos analisados	53
5.2.1 Composição de ácidos gordos nos Eritrócitos (RBC).....	53
5.2.2. Composição de ácidos gordos no Fígado.....	55
5.2.3. Composição de ácidos gordos no Coração.....	56
5.2.4. Composição de ácidos gordos no Rim	56
5.2.5. Composição de ácidos gordos na Gordura Subcutânea.....	57
5.2.6. Composição de ácidos gordos na Gordura Visceral.....	57
5.2.7. Comparação dos níveis de EPA, DPA e DHA nos diferentes órgãos e tecidos	57

5.2.8. Composição em ácidos gordos na Análise Fecal	58
5.3. Optimização da metodologia de extracção de carotenóides.....	59
5.4. Análise da presença de carotenóides na ração e na Chlorella vulgaris	61
5.5. Análise da presença de carotenóides nos órgãos e tecidos recolhidos	62
5.6. Análise da presença de carotenóides nas amostras fecais	63
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	65
7. CONCLUSÃO	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	I

Índice de figuras

Figura 1- Adaptação de microalgas como alimentos funcionais, adaptado de Gouveia <i>et al</i> , 2008.....	2
Figura 2- Alguns exemplos estruturais de ácidos gordos PUFA n-3 e PUFA n-6, adaptado Cannon, 2009.	5
Figura 3- Metabolismo dos ácidos gordos da família n-3 e n-6, adaptado de Schmitz <i>et al</i> , 2008.	6
Figura 4- Processamento dos lípidos obtidos por via exógena, adaptado de Nelson e Cox, 2005.	8
Figura 5- Estrutura molecular representativa de um quilomícron, adaptado de Nelson e Cox, 2005.....	9
Figura 6- Estrutura química do β -caroteno , zeaxantina, luteína e astaxantina adaptado de Del Campo <i>et al</i> , 2007	17
Figura 7- Metabolismo oxidativo do β -caroteno originando retinol (Vitamina A). A clivagem é realizada por uma dioxigenase dependente de oxigénio, adaptado de Tapiero <i>et al</i> , 2004.....	18
Figura 8- Mecanismos e vias envolvidas na absorção, transporte através do plasma e incorporação nos tecidos dos carotenóides, tomando como exemplo o β -caroteno, adaptado de Parker, 1996.	19
Figura 9- Esquema representativo da absorção intestinal dos carotenóides, adaptado de Furr e Clark, 1997.....	20
Figura 10- Intervenção dos carotenóides na prevenção do aparecimento de ROS, adaptado de Rao <i>et al</i> , 2007.	21
Figura 11- Modelo esquemático de ROS pelos carotenóides (CAR), adaptado de Perera e Yen, 2007.....	21
Figura 12- Diferentes doenças, nas quais os carotenóides desempenham papéis importantes, adaptado de Rao <i>et al</i> , 2007	24
Figura 13- Esquema síntese da dualidade dos efeitos antioxidantes e pró-oxidantes do β -caroteno, adaptado de Siems <i>et al</i> , 2005.	24

Figura 14- Esquema representativo do delineamento experimental do grupo suplementado com <i>Diacronema vlkianum</i> e respectivo grupo controlo.	29
Figura 15- GC- FID, Agilent J&W Scientific, EUA.....	30
Figura 16- Esquema representativo do delineamento experimental do grupo suplementado com <i>Chlorella vulgaris</i> e respectivo grupo controlo.....	32
Figura 17- HPLC Agilent 1110, EUA.....	34
Figura 18- Composição percentual dos ácidos gordos dos eritrócitos ao fim de 2 meses no grupo controlo e grupo suplementado: A) Distribuição dos diferentes ácidos gordos; B) Distribuição de ácidos gordos totais em função do grau de saturação; C) Variação da razão de $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ nos diferentes grupos. (*- existência de diferenças significativas entre os grupos- <i>p-value</i> <0,05).....	37
Figura 19 - Variação percentual de ácidos gordos dos eritrócitos em diferentes etapas do estudo no grupo suplementado com <i>D.vlkianum</i> . A) Variação dos diferentes ácidos gordos ao longo do tempo; B) Variação dos ácidos gordos totais em função do grau de saturação ao longo do tempo; C) Variação da razão $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ ao longo do tempo (*- existência de diferenças significativas entre os grupos- <i>p-value</i> <0,05).	38
Figura 20- Composição percentual dos ácidos gordos do fígado ao fim de 2 meses no grupo controlo e grupo suplementado: A) Distribuição dos diferentes ácidos gordos; B) Distribuição de ácidos gordos totais em função do grau de saturação; C) Variação da razão de $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ nos diferentes grupos. (*- existência de diferenças significativas entre os grupos- <i>p-value</i> <0,05). ...	39
Figura 21- Variação percentual de ácidos gordos do fígado em diferentes etapas do estudo no grupo suplementado com <i>D.vlkianum</i> : A) Variação dos diferentes ácidos gordos ao longo do tempo;B) Variação dos ácidos gordos totais em função da saturação ao longo do tempo; C) Variação da razão $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ ao longo do tempo (*- existência de diferenças significativas entre os grupos- <i>p-value</i> <0,05).	40
Figura 22- Composição percentual dos ácidos gordos do coração ao fim de 2 meses no grupo controlo e grupo suplementado A) Distribuição dos diferentes ácidos gordos; B) Distribuição de ácidos gordos totais em função do grau de saturação; C) Variação da razão de $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ nos diferentes grupos. (*- existência de diferenças significativas entre os grupos- <i>p-value</i> <0,05)	41
Figura 23- Variação percentual de ácidos gordos do coração em diferentes etapas do estudo no grupo suplementado com <i>D.vlkianum</i> : A) Variação dos diferentes ácidos gordos ao longo do tempo; B) Variação dos ácidos gordos totais em função do grau de saturação ao longo do	

tempo; C) Variação da razão $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ ao longo do tempo (*- existência de diferenças significativas entre os grupos- $p\text{-value}<0,05$). 41

Figura 24- Composição percentual dos ácidos gordos do rim ao fim de 2 meses no grupo controlo e grupo suplementado: A) Distribuição dos diferentes ácidos gordos; B) Distribuição de ácidos gordos totais em função do grau de saturação; C) Variação da razão de $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ nos diferentes grupos (*- existência de diferenças significativas entre os grupos- $p\text{-value}<0,05$). 42

Figura 25- Variação percentual de ácidos gordos do rim em diferentes etapas do estudo no grupo suplementado com *D.vlkianum*: A) Variação dos diferentes ácidos gordos ao longo do tempo; B) Variação dos ácidos gordos totais em função do grau de saturação ao longo do tempo; C) Variação da razão $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ ao longo do tempo (*- existência de diferenças significativas entre os grupos- $p\text{-value}<0,05$). 43

Figura 26- Composição percentual dos ácidos gordos da gordura subcutânea ao fim de 2 meses no grupo controlo e grupo suplementado: A) Distribuição dos diferentes ácidos gordos; B) Distribuição de ácidos gordos totais em função do grau de saturação; C) Variação da razão de $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ nos diferentes grupos (*- existência de diferenças significativas entre os grupos- $p\text{-value}<0,05$). 44

Figura 27- Variação percentual de ácidos gordos da gordura subcutânea em diferentes etapas do estudo no grupo suplementado com *D.vlkianum*: A) Variação dos diferentes ácidos gordos ao longo do tempo; B) Variação dos ácidos gordos totais em função do grau de saturação ao longo do tempo; C) Variação da razão $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ ao longo do tempo (*- existência de diferenças significativas entre os grupos- $p\text{-value}<0,05$). 44

Figura 28- Composição percentual dos ácidos gordos da gordura visceral ao fim de 2 meses no grupo controlo e grupo suplementado: A) Distribuição dos diferentes ácidos gordos; B) Distribuição de ácidos gordos totais em função do grau de saturação; C) Variação da razão de $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ nos diferentes grupos (*- existência de diferenças significativas entre os grupos- $p\text{-value}<0,05$). 45

Figura 29- Variação percentual de ácidos gordos da gordura visceral em diferentes etapas do estudo no grupo suplementado com *D. vlkianum*: A) Variação dos diferentes ácidos gordos ao longo do tempo; B) Variação dos ácidos gordos totais em função do grau de saturação ao longo do tempo; C) Variação da razão $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ ao longo do tempo (*- existência de diferenças significativas entre os grupos- $p\text{-value}<0,05$). 46

Figura 30- Comparação entre a percentagem relativa de EPA A), DPA B) e C) DHA nos diferentes órgãos e tecidos analisados (GV- Gordura Visceral; GS- Gordura Subcutânea, RBC-eritrócitos; * - existência de diferenças significativas ($p<0,05$)).....	47
Figura 31- A) Variação percentual de ácidos gordos totais na análise fecal ao longo do tempo no grupo controlo; B)Variação de $\Sigma n-3$ e $\Sigma n-6$ ao longo do tempo no grupo controlo; C) Variação percentual de ácidos gordos totais em função da sua saturação na análise fecal ao longo do tempo no grupo suplementado; D) Variação percentual de $\Sigma n-3$ e $\Sigma n-6$ ao longo do tempo no grupo suplementado.	48
Figura 32- Representação do cromatograma dos padrões e respectivos tempos de retenção (astaxantina $rt\approx 11-12$ min;luteína $rt\approx 15-16$ min, zeaxantina $rt\approx 16-17$ min e β -caroteno $rt\approx 30-35$ min).	50
Figura 33- Cromatograma obtido para a <i>Chlorella vulgaris</i> (1: Astaxantina; 2:Luteína; 3:Zeaxantina; 4: β caroteno).....	50
Figura 34- Cromatograma exemplo da análise de carotenóides do fígado no grupo controlo (A) e suplementado (B)	51
Figura 35- A) Eliminação da astaxantina (%m/m) ao longo do tempo em ratinhos suplementados; B) Eliminação da luteína (%m/m) ao longo do tempo em ratinhos suplementados; C) Eliminação da zeaxantina (%m/m) ao longo do tempo em ratinhos suplementados; D) Eliminação do β -caroteno (%m/m) ao longo do tempo em ratinhos suplementados.....	52

Índice de tabelas

Tabela 1-Perfil dos ácidos gordos em percentagem relativa determinados para a *Diacronema vlkianum* (A) e para a ração (B) (D.P.- desvio padrão; N. D.- Não detectado)..... 36

Tabela 2- Diferentes parâmetros metodológicos analisados para os diferentes carotenóides . *a*-ordenada na origem; *b*-declive; *r*-producto de correlação;*t* -parâmetros estatísticos; *S_a*- desvio padrão da ordenada na origem; *S_b*- desvio padrão do declive; LD- limite de detecção; LQ- limite de quantificação. 49

Tabela 3- Perfil percentual dos carotenóides na microalga *C. vulgaris* e na ração..... 51

Índice de ANEXOS

Tabela 1-Valores de média e desvio padrão para os respectivos ácidos gordos nos diferentes grupos em diferentes fases do estudo nos eritrócitos. (*- existência de diferenças significativas com $p\text{-value}<0,05$; ↑-aumento;↓- decréscimo; (=)- mantido) I

Tabela 2- Valores de média e desvio padrão para os respectivos ácidos gordos nos diferentes grupos em diferentes fases do estudo no fígado. (*- existência de diferenças significativas com $p\text{-value}<0,05$; ↑-aumento;↓- decréscimo; (=)- mantido)II

Tabela 3-Valores de média e desvio padrão para os respectivos ácidos gordos nos diferentes grupos em diferentes fases do estudo no coração. (*- existência de diferenças significativas com $p\text{-value}<0,05$; ↑-aumento;↓- decréscimo; (=)- mantido) III

Tabela 4-Valores de média e desvio padrão para os respectivos ácidos gordos nos diferentes grupos em diferentes fases do estudo no coração. (*- existência de diferenças significativas com $p\text{-value}<0,05$; ↑-aumento;↓- decréscimo; (=)- mantido) IV

Tabela 5- Valores de média e desvio padrão para os respectivos ácidos gordos nos diferentes grupos em diferentes fases do estudo na gordura subcutânea. (*- existência de diferenças significativas com $p\text{-value}<0,05$; ↑-aumento;↓- decréscimo; (=)- mantido)..... V

Tabela 6-Valores de média e desvio padrão para os respectivos ácidos gordos nos diferentes grupos em diferentes fases do estudo na gordura visceral. (*- existência de diferenças significativas com $p\text{-value}<0,05$; ↑-aumento;↓- decréscimo; (=)- mantido)..... VI

Tabela 7-Valores de média e desvio padrão para a concentração em $\mu\text{g/mL}$ e em percentagem massa/massa da excreção diária de astaxantina, luteína, zeaxantina e β -caroteno. (D.P.- desvio padrão)..... VII

RESUMO

As microalgas são uma potencial fonte para a obtenção de variados compostos biologicamente activos (carotenóides, ácidos gordos, vitaminas e polissacáridos), com uma eficácia superior à verificada pelas tradicionais culturas vegetais terrestres. São por isso consideradas ingredientes funcionais, o que conduziu ao recente aumento do seu interesse comercial.

A produção de microalgas compreende conhecimentos e competências multidisciplinares como: biotecnologia e aspectos nutricionais. Sendo esta última área um campo de pesquisa emergente, pois possibilita a avaliação da biodisponibilidade de diversos compostos.

A importância terapêutica dos ácidos gordos polinsaturados n-3 (PUFA n-3) em particular o ácido eicosapentaenóico (EPA; 20:5n-3) e o ácido docosahexaenóico (DHA; 22:6n-3) é bem conhecida. Actualmente, a maior fonte de EPA e DHA é obtida pelo pescado. Contudo, as microalgas marinhas sintetizam PUFA n-3 em elevadas quantidades, o que as torna atractivas do ponto de vista nutricional. Concomitantemente, a síntese de carotenóides pela maioria das microalgas é uma alternativa viável como suplemento dietético.

O trabalho desenvolvido visa avaliar as potencialidades de novos ingredientes funcionais na dieta humana: microalga *Diacronema vlkianum*, como fonte de ómega-3, e *Chlorella vulgaris* na sua variante laranja, como fonte de pigmentos antioxidantes.

O estudo foi desenvolvido em modelos animais (*ratinhos Wistar*), e compreendeu a avaliação da bioincorporação de ácidos gordos e carotenóides após a suplementação respectiva com *Diacronema vlkianum* (2 meses) e *Chlorella vulgaris* (1 mês). A determinação de ácidos gordos foi feita com recurso à Cromatografia Gás-Líquido com detector de Ionização de Chama (GC – FID). Já, a aferição de carotenóides foi executada através da Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC).

A suplementação com *Diacronema vlkianum* revelou ter um impacto na mudança da composição de EPA, DPA e da razão $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ nos tecidos analisados, indicando assim ser uma boa fonte de ómega-3.

A análise da incorporação de carotenóides nos tecidos após suplementação com *Chlorella vulgaris* não permitiu a obtenção de resultados conclusivos, o que pressupõe uma nova abordagem metodológica no futuro.

Palavras Chave: Ingredientes funcionais, microalgas (*Diacronema vlkianum*, *Chlorella vulgaris* (laranja)), PUFA n-3, carotenóides, GC-FID e HPLC.

ABSTRACT

Microalgae are considered a potential source of a wide spectrum of biologically active chemicals, such as: carotenoids, fatty acids, vitamins, and polysaccharides with a superior efficacy in relation to the traditional culture of vegetables. These microorganisms have been considered in a near past as potential source of functional food, which increase their commercial value.

The production and consumption of microalgae requires multidisciplinary skills: biotechnology and nutritional aspects. This last area is emerging due to the allowance of a better knowledge of the assessment of toxicology and the bioavailability of the biomolecules in research.

The importance of the therapeutic value of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA n-3), especially eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 n-3) is well recognised. Nowadays, seafood is the major EPA and DHA dietary source. However, microalgae are also excellent producers of n-3 long chain fatty acids, making them an attractive source of PUFA n-3. Likewise, the majority of microalgae seem to be a viable alternative for carotenoids supply.

This work aims to investigate the possible adoption of new functional ingredients in human diet: microalgae *Diacronema vlkianum* as a source of PUFA n-3, and *Chlorella vulgaris* (orange) as a font of carotenoids with antioxidant capacity. In order to understand the effect of fatty acid and carotenoid daily supplementation, the study was developed in two different parts. In both parts of the studie *Wistar* rats were used as an animal model.

The tissues and organs collected were analysed by Liquid Chromatography (GC-FID), for determination of fatty acids percentages and by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) for carotenoids quantification in the tissues.

The study with *D. vlkianum* revealed a significative increase of EPA, DPA and Σ n-3/ Σ n-6 in the tissues of supplemented rats.

The carotenoids incorporation study didn't reveal any tissue assimilation, which implies a new approach in future studies.

Key Words: Functional Food, microalgae (*Diacronema vlkianum*, *Chlorella vulgaris* (Orange)), PUFAs n-3, carotenoids, GC-FID and HPLC.

1.INTRODUÇÃO

O presente trabalho destina-se a averiguar a potencialidade de duas microalgas distintas (*Diacronema vlkianum* e *Chlorella vulgaris*), como fonte de ómega- 3 e pigmentos antioxidantes (carotenóides). Segue-se pois uma breve introdução teórica sobre diferentes conteúdos e temáticas com particular importância para a compreensão do estudo efectuado.

1.1. Alimentos funcionais - aspectos gerais

A procura por alimentos funcionais sofreu um aumento nos últimos tempos, como consequência do crescente interesse dos consumidores por alimentos benéficos para a saúde. O acréscimo da procura deste tipo de alimentos foi motivado pelo aumento dos custos dos cuidados de saúde, aumento da esperança média de vida e pela preocupação da população no melhoramento da qualidade de vida (Plaza *et al*, 2009). De modo, a dar resposta a esta procura, a indústria alimentar tem vindo a desenvolver a produção de alimentos apelativos de baixo custo e cada vez mais saudáveis.

O conceito de “alimento funcional” foi criado e introduzido primariamente no início dos anos 80 no Japão. O novo conceito visava a promoção da qualidade de vida dos consumidores, assim como a redução nos custos dos cuidados de saúde relativos a uma população numerosa com elevada esperança média de vida (Plaza *et al*, 2009). Uma década mais tarde foi criado na Europa (1990) uma entidade – ILSI (*International Life Science Institute*), destinada a estabelecer a correlação científica entre uma dieta rica em determinados nutrientes e a possibilidade na prevenção de doenças. Nos Estados Unidos da América (EUA), por sua vez, este protocolo é actualmente ministrado pela FDA (*Food and Drug Administration*), criada em 1906 (Plaza *et al*, 2009).

Presentemente, existem inúmeras abordagens para definir alimentos funcionais. Segundo o *Institute of Medicine’s Food and Nutrition Board* (FNB), “alimento funcional” é: “Qualquer alimento ou constituinte alimentar com eventuais benefícios na promoção da saúde e prevenção de doença, independentes da função de nutriente essencial”. Este conceito engloba alimentos que são constituídos por nutrientes benéficos para a saúde, tais como carotenóides, polifenóis, flavenóides, fibras, ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (LC-PUFA), pigmentos antioxidantes, entre outros (Day *et al*, 2009; Diplock *et al*, 1998). É, no entanto, necessário ter em conta, que os alimentos funcionais (naturais, ou modificados), são susceptíveis de melhorar a saúde, sem no entanto, curar ou prevenir doenças. Contrariamente ao que se possa pensar, este tipo de alimentos não representa a panaceia para todas as doenças, mas pode sim, ser visto como complemento saudável a adoptar numa dieta apropriada (Day *et al*, 2009).

1.1.1. Microalgas como ingredientes funcionais

A maioria das microalgas representa um grupo diversificado de microrganismos fotossintéticos, de elevado potencial energético.

Actualmente, estima-se a existência de 200 000 espécies de microalgas diferentes (Derner *et al*, 2006; Hu *et al*, 2008). Ao longo dos anos, estes microrganismos foram classificados de acordo com a natureza química dos pigmentos resultantes do seu metabolismo e respectivos constituintes da parede celular (Hu *et al*, 2008). O termo microalga não possui valor taxonómico, mas engloba microrganismos algais que contenham clorofila e outros pigmentos fotossintéticos. Porém, mais recentemente alguns autores introduziram novos parâmetros para a classificação das microalgas, designadamente, aspectos citológicos e aspectos morfológicos (estrutura de flagelos, ocorrência de células flageladas e divisão celular) (Derner *et al*, 2006).

A classificação mais comum entre a comunidade científica divide as microalgas em dois grupos distintos consoante a sua estrutura celular. Assim, microalgas procarióticas pertencem às Divisões Cyanophyta e Prochlorophyta, enquanto que as microalgas eucarióticas são agrupadas nas Divisões: Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xantophyceae, entre outras), Cryptophyta e Dinophyta (Derner *et al*, 2006).

A introdução deste tipo de microrganismos na alimentação humana remonta a tempos longínquos, onde eram utilizadas como fonte de proteínas por antigas tribos africanas do Chade e por índios Aztecas (Derner *et al*, 2006). Todavia, a primeira comercialização de microalgas como fonte nutricional, realizou-se somente em 1960 (Japão). Pouco tempo depois, a aferição



Figura 1- Adaptação de microalgas como alimentos funcionais, adaptado de Gouveia *et al*, 2008.

do elevado teor proteico da espécie *Spirulina sp.* (>60%) conduziu à sua introdução no mercado americano (Ambrosi *et al*, 2008). Apesar de tudo, o aumento exponencial da produção de microalgas no contexto de alimentos funcionais só se verificou recentemente, com a avaliação do seu potencial biológico, biotecnológico e nutricional (figura 1) (Ambrosi *et al*, 2008; Derner *et al*, 2006; Spolaore *et al*, 2006). O comércio relativo a este tipo de produtos sofreu então uma vasta expansão, de tal modo que, nos

últimos anos, países como Israel, Brasil, França, México e Tailândia tornaram-se grandes produtores de biomassa microalgal, sendo, actualmente, no Japão que se regista um consumo maioritário deste tipo de alimentos (Ambrosi *et al*, 2008, Becker, 2004; Borowitzka, 1999; Derner *et al*, 2006; Grima *et al*, 1995; Spolaore *et al*, 2006).

Para além, de representarem uma fonte de novas moléculas biologicamente activas e complexas do ponto de vista químico, a produção de microalgas apresenta vantagens comerciais, uma vez que são facilmente cultiváveis (Derner *et al*, 2006; Fujitani *et al*, 2001; Pulz e Gross, 2004; Spolaore *et al*, 2006). Como referido anteriormente o facto de este tipo de microrganismos ser muito heterogéneo e excepcionalmente multifacetado, possibilita uma colonização e adaptação aos mais variados *habitats* (Derner *et al*, 2006; Hu *et al*, 2008). Assim sendo, o seu cultivo é exequível em áreas e climas inóspitos (desertos e costas marítimas), e até em terrenos inférteis, o que exige menor quantidade e qualidade de água, sem a necessidade de uma utilização de herbicidas e pesticidas (Becker, 2004; Donato *et al*, 2003; Fidalgo *et al*, 1998). Ademais, como a sua cultura não tem dependência sazonal, as microalgas podem ser colhidas diariamente.

Devido ainda, à sua eficiência fotossintética (muito elevada), verifica-se que o seu crescimento tem um impacto positivo na minimização do efeito de estufa e as alterações climáticas do planeta (Becker, 2004; Donato *et al*, 2003; Fidalgo *et al*, 1998).

É necessário ter igualmente em conta, que os estádios de crescimento das microalgas são severamente sensíveis a condicionamentos externos. Como tal, a manipulação das condições de cultivo nomeadamente a presença ou ausência de determinados nutrientes, controlo de temperatura, controlo da intensidade luminosa e fotoperíodo na fase de crescimento da microalga, pode estimular a biossíntese de compostos que vão desde enzimas a fármacos antioxidantes naturais (Behrens e David, 1996; Sánchez *et al*, 2000). O perfil nutricional das microalgas é então variável de acordo com as condições de crescimento. Em alguns casos, torna-se ainda viável recorrer à engenharia genética de forma a otimizar a expressão desses mesmos enzimas, antioxidantes e compostos nutricionais (Fidalgo *et al*, 1998; Grima *et al*, 1995; Gouveia *et al*, 1996; Pulz e Gross, 2004).

Os extractos de microalgas podem até ser incorporados em produtos de dermocosmética, por exemplo, cremes anti-envelhecimento, regenerantes, emolientes e exfoliantes anti-irritantes. Dois exemplos são um extracto rico em proteínas de *Arthrospira sp.* que repara os sinais de envelhecimento precoce da pele, exercendo um efeito alisante e preventivo de estrias (Protulines, Exsymol S.A.M., Monaco) ou ainda, um extracto de *Chlorella vulgaris* habitualmente utilizado para estimular a síntese de colagénio na pele, o que permite a regeneração dos tecidos e redução das rugas (Dermochlorella, Codif, St. Malo) (Spolaore *et al*, 2006).

1.2. Microalgas como fonte de PUFA n-3

Os lípidos tipicamente extraídos das microalgas são maioritariamente constituídos por glicerol, bases azotadas esterificadas e por ácidos gordos de cadeia longa, havendo a

possibilidade de serem saturados (SFA), mono (MUFA) ou polinsaturados (PUFA) (Whelan e Cherly, 2006).

A maioria das microalgas sintetiza ácidos gordos de particular interesse, nomeadamente o ácido γ -linoléico (GLA, 18:3n-6) (*Arthrospira*), ácido araquidónico (AA, 20:4n-6) (*Porphyridium*), EPA (*Nannochloopsis*, *Phaeodactylum*, *Nitzschia*, *Isochrysis*, *Diacronema*) e DHA (*Cryptocodinium*, *Schizochytrium*). Os constituintes lipídicos da biomassa das microalgas pode variar entre 1 a 40% do seu peso seco. Conquanto, é possível que em determinadas condições de cultivo esta fracção chegue a representar 85% do seu peso seco (Derner *et al*, 2006). De acordo com Behrens e David (1996), a maior fracção de lípidos totais (25 a 60%) que as microalgas produzem corresponde ao tipo de ácidos gordos PUFA de cadeia longa (LC-PUFA) (Behrens e David, 1996; Brown, 1991).

A maior fonte de PUFA de cadeia longa na alimentação era obtida até à data, através do pescado, óleo de peixe (PUFA n-3) e igualmente de óleos vegetais (PUFA n-6) como milho ou óleo de soja. Assiste-se, todavia, ao crescente declínio de stocks globais de pescado devido não só à generalização dos métodos de pesca, mas também à crescente contaminação dos mares e rios com a inúmera variedade de poluentes (Beelen, 1988; Cannon, 2009; Certik e Shimizu, 1999; Doughman *et al*, 2007; Guschina e Harwood, 2006; Ramadan e Morsel, 2002).

É importante ter em consideração que o EPA e o DHA não são produzidos pelo pescado, mas sim pelas microalgas marinhas acumuladas ao longo da cadeia trófica. (Calder, 2004; Moyad, 2005) Como tal, o consumo de microalgas por Humanos é uma alternativa viável para a obtenção de LC-PUFA (Guschina e Harwood, 2006). Esta é uma mudança exequível, não só para os adeptos da dieta vegetariana, como para os que não sejam apreciadores de peixe, visto permitir a obtenção de LC-PUFA na dieta sem que o indivíduo seja sujeito ao odor desagradável típico do peixe (Cannon, 2009). Consequentemente nos últimos anos, a produção comercial de óleos ricos em n-3 PUFA a partir de microalgas cresceu, de tal modo que, nos EUA, complementos dietéticos com óleos de microalgas são utilizados em 84% das fórmulas infantis (Beelen *et al*, 2009).

1.2.1. Ácidos Gordos, propriedades gerais

Os lípidos apresentam propriedades físicas, químicas, mas também fisiológicas que os tornam importantes na incorporação na dieta. Estruturalmente este tipo de compostos é muito heterogéneo, tendo como denominador comum o facto de serem imiscíveis na água e solúveis em solventes orgânicos. Os lípidos caracterizam-se ainda por serem biomoléculas compostas por carbono (C), hidrogénio (H) e oxigénio (O) (Nelson e Cox, 2005).

Estas biomoléculas são conhecidas pelas suas propriedades homeostáticas nos seres vivos, principalmente a nível do isolamento térmico e depósito de reservas energéticas.

Participam ainda na composição das estruturas membranares biológicas, actuam como cofactores enzimáticos, mensageiros intracelulares, transportadores de electrões, desempenhando simultaneamente funções hormonais (Nelson e Cox, 2005).

Os ácidos gordos são moléculas orgânicas constituídas por uma cadeia alquilo com um grupo carboxilo no terminal da sua estrutura. Este é o grupo de lípidos mais abundante no organismo humano. Na sua maioria os ácidos gordos encontram-se sob a forma esterificada em glicerol (mono, di e triacilgliceróis (TAG)) ou sob forma dos seus derivados (glicolípidos, fosfolípidos (PL)), ésteres de colesterol, e finalmente em menor abundância como ácidos gordos livres (FFA) (Nelson e Cox, 2005; Snider *et al*, 2006).

A classificação dos ácidos gordos baseia-se de acordo com o comprimento e grau de insaturação da respectiva cadeia de carbono. De acordo com o comprimento da mesma, a cadeia de carbono pode ser classificada como pequena (4-6 carbonos), média (8-12 carbonos), longa (14-20 carbonos) e muito longa (≥ 22 carbonos). Tendo em conta o grau de insaturação, os ácidos gordos podem ser qualificados em ácidos gordos saturados (sem duplas ligações),

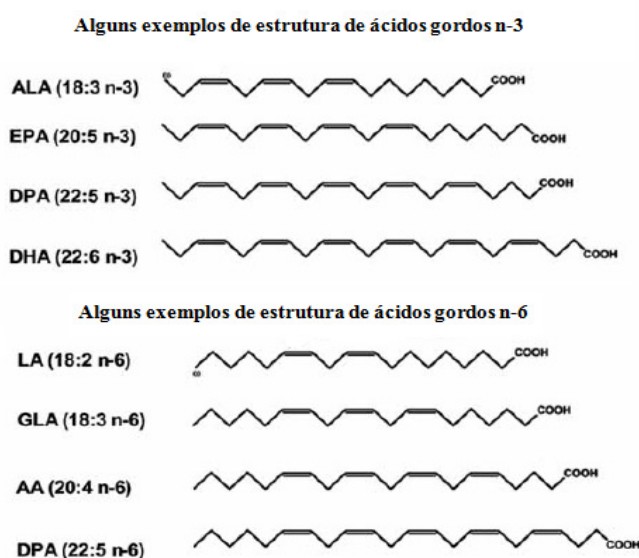


Figura 2- Alguns exemplos estruturais de ácidos gordos PUFA n-3 e PUFA n-6, adaptado Cannon, 2009.

monoinsaturados (com uma dupla ligação) e polinsaturados (com duas ou mais ligações duplas) (Burgde *et al*, 2005; Nelson e Cox, 2005). No caso dos PUFA de cadeia longa, os mais frequentes são classificados como n-3 ou n-6 consoante a localização da última ligação dupla relativamente ao grupo metilo terminal (figura 2) (Cannon, 2009).

A maioria dos ácidos gordos nos humanos é obtida através do metabolismo, no entanto, existem

excepções: o ácido linoleico (18:2n-6; LA), precursor da série n-6, e o ácido α -linolénico (18:3n-3; ALA), precursor da série n-3 (Innis *et al*, 2005; Nakamura e Nara, 2003).

Os efeitos das elongases e dessaturases no ácido palmitoléico, oléico, linoléico e α -linolénico originam a formação de 4 séries distintas de ácidos gordos: n-9, n-7, n-6 e n-3, pelo que cada ácido gordo sintetizado numa série não é originado a partir de outra (Nakamura e Nara, 2003). Cada elongase ou dessaturase actua de modo distinto na série correspondente, o que implica competição entre as séries. Elongases e dessaturases, como é o caso da Δ -6 dessaturase, têm uma afinidade mais elevada para ácidos gordos saturados, sendo a ordem de

acção preferencial das dessaturases estabelecida do seguinte modo: n-3 > n-6 > n-9 (Innis *et al*, 2005; Nakamura e Nara, 2003).

O facto de o organismo humano não possuir o enzima dessaturase responsável pela inserção da dupla ligação nas posições n-3 e n-6, faz com que o LA e o ALA sejam considerados ácidos gordos essenciais (EFA) (Schmitz *et al*, 2008).

No organismo humano, o ácido araquidónico (AA) pode ser originado a partir do LA e o EPA e DHA são sintetizados a partir do ALA, como indica a figura 3 (Schmitz *et al*, 2008).

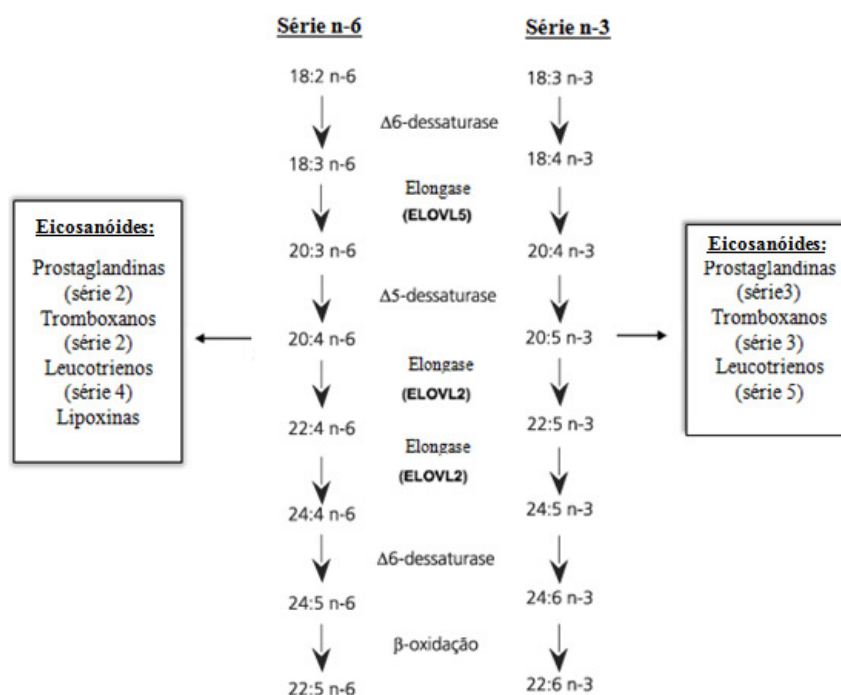


Figura 3- Metabolismo dos ácidos gordos da família n-3 e n-6, adaptado de Schmitz *et al*, 2008.

Actualmente, a ISSFAL (*The International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids*) recomenda a ingestão diária de LA e α -ALA respectivamente em 1% e 0,2% da energia total ingerida, para humanos tipicamente saudáveis (Calder, 2004). Porém, algumas dietas ocidentais não chegam a incluir metade do valor da dose diária recomendada de ALA (Bourre, 2005).

Quer o ALA quer o LA são convertidos em ácidos gordos de cadeia muito longa por dessaturação e alongação, nos humanos. Contudo, a conversão de ALA a LA não é um processo com elevada eficiência, provavelmente, pelo facto de a dessaturação de ALA na presença de excesso de LA nos tecidos, como a pele, ser um processo moroso (Bourre, 2005). A comunidade científica alerta também que somente os humanos adultos saudáveis se encontram aptos a alongar LA a EPA, embora numa taxa inferior a 5%, e a converter EPA em DHA numa taxa inferior a 0,05%. Esta capacidade de conversão parece ser inexistente em crianças e idosos (Burdge e Calder, 2005; Conquer e Holub, 1996; Thies *et al*, 2003).

O modo como se obtêm os ácidos gordos a partir da dieta parece alicerçar-se nos processos de absorção, distribuição e incorporação nos tecidos. Sabe-se que uma dieta rica em gordura é maioritariamente constituída por TAG (90%) e apresenta uma menor proporção em fosfolípidos (3-6%), colesterol, ésteres de colesterol, ácidos gordos livres ou não esterificados (NFFA), bem como as vitaminas A, E, K (Doughman *et al*, 2007; Ramírez *et al*, 2001).

1.2.2. Digestão, Absorção e Transporte dos ácidos gordos

Existem duas vias de obtenção de lípidos: uma via exógena, em que os lípidos são obtidos a partir da dieta, e uma via endógena em que os lípidos são biossintetizados de outros compostos como a glucose. Na via endógena a glucose é o precursor maioritário da síntese de ácidos gordos. A glucose providencia ainda moléculas de carbono para a síntese de ácidos gordos (via Acetil CoA) com o auxílio do enzima NADPH. O excesso de glúcidos da dieta não requeridos para produção de energia e síntese de glicogénio é convertido em ácidos gordos no fígado. Outros substratos como os aminoácidos também contribuem para o processo da lipogénese (Nelson e Cox, 2005).

A via exógena, por sua vez é composta por 3 fases distintas (ver figura 4):

- Digestão, em que os lípidos da dieta são modificados física e quimicamente originando moléculas mais simples;
- Absorção, em que o material digerido é transportado para as células da mucosa intestinal, e aí reconstituído;
- Transporte, em que os lípidos absorvidos são transportados da mucosa intestinal para os tecidos através do sistema linfático e sanguíneo (Nelson e Cox, 2005).

O processo da digestão dos lípidos inicia-se na boca, ocorrendo a dispersão dos componentes da gordura, sob a forma de bolo alimentar. Após esta pré-digestão o bolo alimentar entra no duodeno, onde ocorre absorção (Mu e Høy, 2004).

A absorção é dividida em 3 etapas: emulsificação, hidrólise e absorção propriamente dita. Em primeiro lugar, os sais biliares através de acções mecânicas e químicas, emulsificam as gorduras da dieta no intestino delgado formando micelas. A formação de micelas resulta na combinação dos produtos da digestão dos lípidos com os ácidos biliares e fosfolípidos, adoptando uma conformação esférica, o que permite que os lípidos se difundam através do lúmen intestinal e sejam absorvidos para os enterócitos (Nelson e Cox, 2005; Snider *et al*, 2006).

No intestino delgado, as gorduras emulsificadas sofrem acção de enzimas hidrolíticas hidrossolúveis para que possam ser absorvidos (etapa da hidrólise) (Mu e Høy, 2004). Nesta etapa actuam: lipases pancreáticas e gástricas que catalisam a hidrólise dos TAG a monoacilgliceróis do tipo sn-2 (75% de conservação nesta posição) e ácidos gordos livres; a

fosfolipase A2 (PLA 2) que hidrolisa os PL na superfície das emulsões (este enzima é segregado no pâncreas de forma inactiva (pró-fosfolipase A2), tornando-se activa pela consequência da acção hidrolítica da tripsina) e hidrolases pancreáticas dos ésteres de colesterol que hidrolisam os ésteres de colesterol, gerando colesterol e NEFA. Todos os enzimas envolvidos nesta etapa pertencem ao grupo das esterases, pois catalisam a ruptura da ligação éster, e originam sempre ácidos gordos (Mu e Høy, 2004).

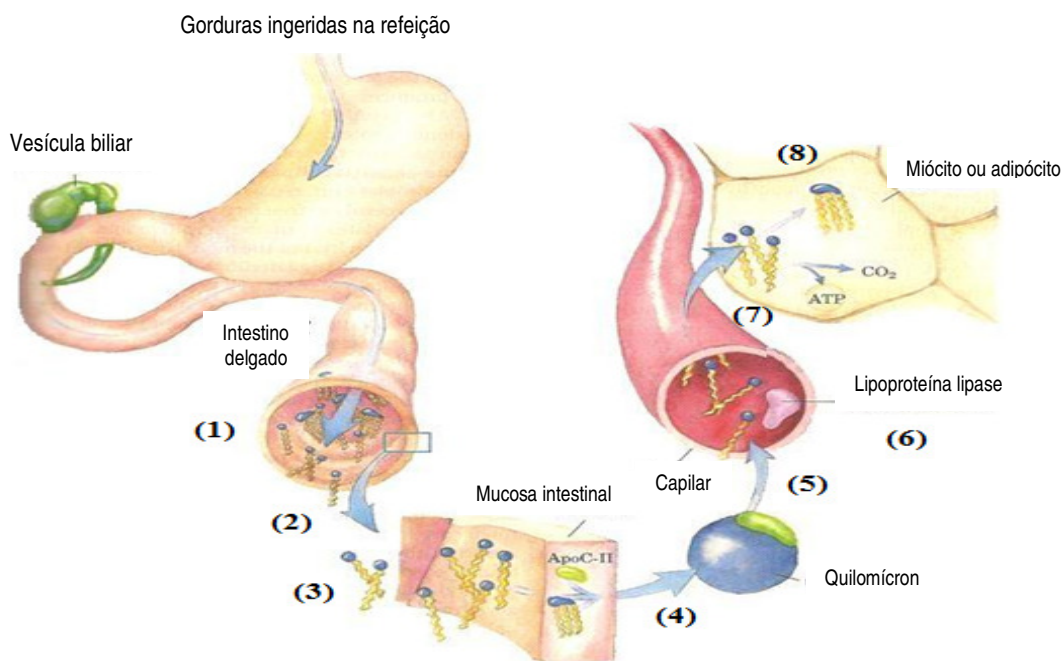


Figura 4- Processamento dos lípidos obtidos por via exógena, adaptado de Nelson e Cox, 2005.

- (1) Os sais biliares emulsificam as gorduras da dieta no intestino delgado, formando micelas.
- (2) As lipases intestinais degradam os TAG.
- (3) Os ácidos gordos e outros produtos provenientes da degradação dos TAG difundem-se nas células epiteliais da mucosa intestinal onde são reconvertidos em TAG.
- (4) Os TAG juntam-se ao colesterol e apolipoproteínas, formando os quilomícrons.
- (5) Os quilomícrons movem-se até aos tecidos, através do sistema linfático e corrente sanguínea.
- (6) Os TAG são convertidos em ácidos gordos e glicerol pela lipoproteína lipase (LPL) activada pela apo C-II.
- (7) Os ácidos gordos atravessam as células.
- (8) Os ácidos gordos são oxidados como combustível ou reesterificados para armazenamento.

A absorção propriamente dita dos ácidos gordos de cadeia curta é feita por difusão simples das células da mucosa para o intestino delgado, sendo a transferência dos ácidos gordos de cadeia longa, mediada por proteínas ligantes a ácidos gordos (FABP) (Mu e Høy, 2004). Na mucosa intestinal ocorre de novo a síntese de TAG no interior dos retículos endoplasmáticos lisos do enterócito. A formação dos triacilgliceróis a partir dos ácidos gordos e do 2-monoacilglicerol envolve uma reacção prévia catalisada pela sintetase de acil-coenzima A. Os ácidos gordos reagem então com o ATP e a coenzima A gerando-se como produtos AMP, pirofosfato e acil-CoA. A sintetase acil-coenzima A, enzima que catalisa a transferência para o grupo acil para o ácido gordo livre, tem uma elevada especificidade para ácidos gordos de

cadeia longa. O grupo acil formado é de seguida transferido por acção catalítica de transferases, ficando o ácido gordo ligado na posição 1 e 3 do 2- monoacilglicerol com a consequente regeneração dos triacilgliceróis (Mu e Høy, 2004; Nelson e Cox, 2005). Os TAG são então incorporados com colesterol e apolipoproteínas formando estruturas moleculares designadas por quilomícra (figura 5), sendo finalmente transportados através do sistema linfático e corrente sanguínea para os diversos tecidos, com incorporação maioritário no tecido adiposo, visto ser o principal local de absorção lipídica (Mu e Høy, 2004, Nelson e Cox, 2005).

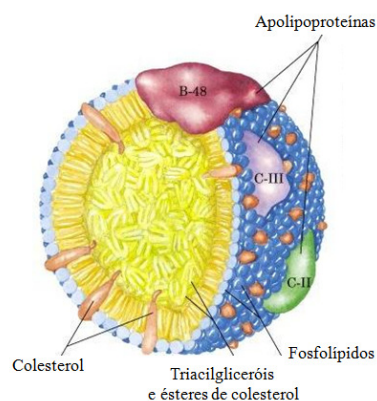


Figura 5- Estrutura molecular representativa de um quilomícron, adaptado de Nelson e Cox, 2005.

A libertação intestinal de quilomícra persiste por várias horas após a ingestão de uma refeição com elevado teor lipídico. Quando na dieta são ingeridos mais ácidos gordos do que os necessários para processos energéticos, o fígado converte-os em TAG e em apolipoproteínas específicas- VLDLs. As VLDLs que são transportadas pela corrente sanguínea até ao tecido adiposo, onde os TAG são removidos e armazenados em gotas lipídicas dentro dos adipócitos (Mu e Høy, 2004; Nelson e Cox, 2005).

É importante ainda salientar que as diferentes propriedades físicas e químicas de cada ácido gordo afecta processos como a digestão, absorção e transporte sanguíneo (Doughman *et al*, 2007; Ramírez *et al*, 2001). Tomando em consideração o comprimento da cadeia dos ácidos gordos, os MCFA são mais facilmente absorvidos que os PUFA, uma vez que os MCFA são solúveis na fase aquosa do meio intestinal, sendo absorvidos mais facilmente através do fígado e da veia porta. Supõe-se que na sua maioria os ácidos gordos da dieta sejam preferencialmente incorporados segundo o seu grau de insaturação- os ácidos gordos saturados são preferencialmente incorporados nos TAG, e os PUFA nos fosfolípidos (Doughman *et al*, 2007; Ramírez *et al*, 2001).

No que respeita ao DHA, EPA, α - ALA ou AA, todos competem pela incorporação na posição sn-2 dos fosfolípidos membranares, pelo que a sua incorporação determina a porção relativa destes e, conseqüentemente, a disponibilidade dos mesmos para a clivagem pela PLA 2 e balanço eicosanóide (He *et al*, 2007; Ramadan e Morsel, 2002).

A composição membranar em ácidos gordos tem assim impacte na função das células e órgãos, mas também numa variedade de processos celulares, sendo o modo de incorporação dos ácidos gordos responsável pelas propriedades biofísicas das membranas, sendo os fosfolípidos os seus principais constituintes (He *et al*, 2007; Ramadan e Morsel, 2002).

1.2.3. Benefícios da incorporação de ácidos gordos n-3 na dieta

A evidência do benefício da ingestão de ácidos gordos n-3 resultou da análise de estudos efectuados em populações de Esquimós da Gronelândia, Esquimós do Alasca e pescadores das zonas costeiras do Japão (Dyerberg *et al*, 1975). Os estudos revelaram que o risco de doenças cardiovasculares (CVD) era superior nas populações Caucásicas, em comparação com as populações de Esquimós estudadas. Estes mesmos estudos demonstraram que os Esquimós apresentavam um nível mais baixo dos valores de colesterol, TAG e de VLDL e um nível elevado de lipoproteínas de alta densidade (HDL) em ambos os sexos, apesar da ingestão de uma maior quantidade de gordura proveniente de mamíferos aquáticos e peixes. A causa maioritária para estas diferenças de valores foi atribuída não ao perfil genético das populações, mas sim ao elevado conteúdo de PUFA n-3 ingerido na dieta tradicional dos Esquimós face à população Caucásica típica (Barrow *et al*, 2009; Dyerberg *et al*, 1975; Medina *et al*, 1998).

Estudos epidemiológicos realizados mais tarde confirmaram que o consumo de gorduras por parte da população de Esquimós rica em ácidos gordos EPA e DHA, o que se encontrava correlacionado com uma função cardioprotectora sobre o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares em indivíduos saudáveis (Albert *et al*, 2005; Barrow *et al*, 2009; Kurowska *et al*, 2003; Sidhu, 2003; Wijendran e Hayes, 2004).

Ao longo dos anos o número de estudos nesta área tem vindo a aumentar, sendo de salientar dois estudos de intervenção em que foi encontrado um efeito cardioprotector associado ao consumo de peixe contendo EPA e DHA:

1) O DART – Diet and Reinfarction Trial - consistiu num estudo de prevenção secundária, em que indivíduos de sexo masculino que anteriormente tinham sofrido um enfarte do miocárdio (MI), ingeriram durante 2 anos cápsulas de óleo com 900 mg/dia de EPA/DHA ou 200-400g/semana de peixe gordo com 500-800 mg/dia de n-3. Neste estudo foi observada uma redução em 29% da mortalidade global, e uma diminuição em 33% da mortalidade originada por doenças cardíacas (Burr *et al*, 1989).

2) O GISSI- Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell' Infarto miocardico - estudo de prevenção secundária com 11324 pacientes sobreviventes a um enfarte do miocárdio, que durante 42 meses receberam cápsulas com 850 mg/dia de EPA + DHA com ou sem vitamina E. Em ambos os casos verificou-se uma redução de 15% na morte por enfarte cardíaco ou por acidente cardiovascular (AVC). A mortalidade global diminuiu 21% e a morte súbita originada por doenças cardíacas diminuiu 45% (GISSI, 1999).

Numa análise global efectuada sobre 11 estudos do género (englobando 22 2364 pessoas e um acompanhamento médio de 11,8 anos), o risco relativo de doenças cardiovasculares face a pessoas com um *intake* inferior a uma porção mensal de peixe, era de

0,85 para o consumo de peixe uma vez por semana, 0,77 para 2-4 vezes/semana e de 0,62 para \geq 5 vezes/semana. Finalmente, por cada aumento em 20g/dia do consumo de pescado a mortalidade registada por doenças cardiovasculares decaía cerca 7% (He *et al*, 2004).

Existem actualmente inúmeras recomendações dos níveis de ingestão de ácidos gordos n-3, para a prevenção da deficiência em EFA e para a diminuição do risco de surgimento de doenças cardiovasculares. A *Organização Mundial de Saúde* (OMS) recomenda, que a ingestão de PUFA n-3 em doses 6 a 10% do valor de energia total ingerida (5-8% PUFA n-6 e 1-2% PUFA n-3), bem como um consumo regular de 1 a 2 porções de peixe gordo por semana, equivalente a 400- 1000 mg/dia de EPA e DHA previnem o surgimento de CVD e AVC isquémico (OMS/FAO 2003).

Harris e von Shacky propuseram em 2004 um novo factor de risco para avaliar a doença coronária: o índice ómega-3, como soma do teor de EPA e DHA na membrana dos eritrócitos. Estes autores demonstraram que o índice ómega-3 era um marcador da ingestão de EPA e DHA num estudo com 5 meses de duração e suplementação crescente de EPA e DHA até 2 g/dia a adultos saudáveis. Apuraram ainda um efeito dose resposta na incorporação até 1g/dia e obtiveram uma correlação positiva com o total de n-3 no sangue total, e na soma de EPA e DHA nos fosfolípidos do plasma. Da análise desta relação entre o índice ómega-3 e o risco da morte por CHD, estes autores concluíram que este risco diminuía em 90% quando o índice ómega-3 aumentava de 4% para valores superiores a 8%(Harris e von Schacky, 2004). Pelos mesmos autores ficou assim definida uma escala de avaliação de risco de morte por CHD, usando como índice de ómega-3, o nível EPA+ DHA na membrana dos eritrócitos: 0-4% zona de risco mais elevada; 4-8%, zona de risco intermédio; superior a 8%, zona de baixo risco (Harris e von Schacky, 2004).

Originalmente os benefícios associados ao consumo de ácidos gordos PUFA n-3 encontravam-se relacionados com os efeitos antitrombóticos (Dyerberg *et al*, 1978). No entanto, estudos recentes apontam para a predominância dos benefícios da ingestão de PUFA n-3 a nível antiarrítmico. Verificou-se que a suplementação em PUFA n-3 em doentes que sofreram enfarte do miocárdio estava correlacionada com diminuição do risco de mortalidade associado a arritmias cardíacas (Wang *et al*, 2006). Estudos *in vitro* mostraram ainda que a adição de EPA/DHA em meios de cultura prevenia a indução de estímulos eléctricos responsáveis por arritmias. Deste modo, a modulação da permeabilidade da membrana plasmática na estabilização dos canais iónicos aponta para as propriedades protectoras do EPA/DHA nas células do tecido muscular do coração. Tal é conseguido com o enriquecimento das membranas cardíacas em EPA e DHA, o que conseqüentemente aumenta a variabilidade do ritmo cardíaco (Mozaffarian *et al*, 2004; Harris e Schacky, 2004; Wang *et al*, 2006).

Um estudo de intervenção com 31 voluntários suplementados com cápsulas de óleo de peixe mostrou que os ácidos gordos DHA e EPA estão relacionados com a diminuição da

pressão arterial. Todavia, o DHA pareceu ter um papel mais importante que o EPA na redução da pressão arterial (Das, 2000; Engler *et al* 1999). Esta diminuição poderia estar relacionada com a inibição do sistema renina-angiotensina (RAS), nomeadamente do enzima conversor da angiotensina (ACE) e consequente inibição da libertação da hormona aldosterona, responsável pelo aumento da pressão sanguínea (Das, 2000; Engler *et al* 1999).

A ingestão de doses diárias de PUFA n-3 encontra-se ainda associada a benefícios nos processos arteroscleróticos e diminuição da agregação plaquetária, assim como, a diminuição da produção de factores de coagulação e factores fibrinolíticos (Harris e Schacky, 2004; Morris *et al*, 1993; Nordoy *et al*, 1993; Thies *et al*, 2003).

Os ácidos gordos PUFA n-3 contribuem para variadas propriedades das membranas como fluidez, flexibilidade, permeabilidade e são essenciais para o correcto funcionamento dos tecidos (Schmitz e Ecker, 2008; Simopoulos, 2002). O ácido gordo EPA compete pelo ácido gordo AA na posição sn-2 dos fosfolípidos da membrana e pelos enzimas envolvidos na síntese de eicosanóides (reguladores autócrinos e parácrinos das funções tecidulares e celulares), ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) e lipoxigenase. Estes eicosanóides são mediadores e reguladores dos mecanismos inflamatórios, modulando a intensidade e duração da resposta imune. Mediante o estímulo das plaquetas e das células endoteliais, o AA libertado, torna-se no substrato para a síntese de prostaglandinas (série 2), tromboxanos (série 2) e leucotrienos (série 4), responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular, da vasodilatação e aumento da produção de citocinas inflamatórias como IL-4, IL-10 e TNF- β e regulação da supressão da produção de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α e CRP (Proteína C reactiva) Calder 2006; Das 2000). Assim, os papéis de PUFA n-6 e n-3 na regulação do processo inflamatório sugerem a importância do seu balanço no desenvolvimento e severidade das doenças de cariz inflamatório. Por isso mesmo, a suplementação em dietas com níveis de PUFA n-3 parece ter um efeito benéfico, como demonstrado por diversos autores em doenças como a artrite reumatóide, doença de Chron, fibrose quística, obesidade, aterosclerose, entre outras (Calder 2006; Das 2000; Garofolo e Petrilli, 2006; He *et al*, 2007; Medina *et al*, 1999; Moyad, 2005).

Entre os possíveis mecanismos da ingestão de PUFA n-3 na redução das doenças cardiovasculares e estabilidade plaquetária, encontra-se descrito o seu efeito na diminuição dos lípidos totais no plasma, diminuição de cerca de 25-30% dos TAG no plasma com diminuição de produção de VLDL (Barrow *et al*, 2009; Morris *et al*, 1993). Estudos aludem também para a correlação entre o consumo de PUFA n-3 com o relaxamento do endotélio, uma vez que a via de vasodilatação é melhorada dependentemente por aumento da produção de NO (óxido nítrico), e independentemente por supressão do influxo de ião cálcio através do canal transmembranar activado por diferenças de potencial nas células do músculo liso e do endotélio (Doughman *et al*, 2007; Hooper *et al*, 2006).

A inibição destes canais contribui ainda para a diminuição das grandes e rápidas flutuações na concentração de cálcio livre, o que contribui para a diminuição das arritmias ventriculares (verificado com a suplementação com cápsulas de óleo de peixe) (Doughman *et al*, 2007; Hooper *et al*, 2006).

Torna-se, então, clara a razão pela qual os PUFA n-3 de cadeia longa, como o DHA ou EPA, são imprescindíveis no metabolismo renal do cálcio e na regulação do balanço normal entre o osso e a calcificação ectópica. Estudos em humanos e estudos experimentais em animais indicaram que o consumo de LC-PUFA promovia a absorção de cálcio, reduzindo a excreção urinária do mesmo e aumentando o conteúdo e densidade de cálcio no osso (Kruger *et al*, 2005). Paralelamente, a suplementação de EPA ou de DHA pareceu favorecer a prevenção do aumento da fragilidade óssea em ratinhos com osteopenia (Kruger *et al*, 2005). Foi ainda observada uma forte correlação entre a ingestão de DHA e EPA e consequente aumento de cálcio no osso e redução da excreção urinária de desoxipiridinolinas (Kruger *et al*, 2005).

Vários estudos epidemiológicos apontam ainda para um efeito benéfico da ingestão diária de doses de EPA/DHA no impacto da diminuição do risco de incidência de determinados tipos de cancro, como cancro da mama, próstata, cancro do cólon face aos indivíduos que na sua dieta têm uma baixa ingestão de EPA/DHA (Beelen *et al*, 2009).

Os ácidos gordos n-3 como referido previamente são componentes estruturais das membranas dos fosfolípidos, servindo até de moduladores biossintéticos e mediadores celulares. O DHA é selectivamente concentrado na membrana sináptica e nas membranas da retina, pensando-se estar relacionado com a função visual, desenvolvimento cerebral, comportamento e aprendizagem (Dyall e Michael- Titus, 2008).

Como referido anteriormente, embora seja possível a biossíntese de EPA e DHA através do ácido gordo ALA, a taxa de produção não é satisfatória para suprir o desenvolvimento intra-uterino a partir das 18 semanas, desenvolvimento este que se processa num nível acelerado (Dyall e Michael- Titus, 2008; Lien, 2009). Alguns estudos revelaram que a concentração de DHA no plasma sanguíneo durante o período de gestacional, assim como o consumo de peixe rico neste ácido gordo se encontra relacionada posteriormente com propriedades no desenvolvimento cognitivo e visual das crianças (Dyall e Michael- Titus, 2008; Lien, 2009; Ward e Singh, 2005). Daí a necessidade de incorporar estes ácidos gordos nas fórmulas infantis, para garantir que os recém-nascidos e crianças desenvolvam a componente cognitiva e visual adequada. Estudos mais recentes comprovaram similarmente o efeito benéfico dos PUFA n-3 a nível neurológico, efeito anti-depressivo e saúde mental (Dyall e Michael- Titus, 2008; Kimura *et al*, 2005; Ward e Singh, 2005). A participação de EPA e DHA no sistema nervoso autónomo é pois evidente, uma vez que estão associados à diminuição da activação do sistema simpático, aumentando a actividade do sistema parassimpático, reduzindo dessa forma o risco cardiovascular (Mazza *et al* 2007).

Indirectamente a ingestão de EPA/DHA pode-se encontrar relacionada com a prevenção do desenvolvimento de diabetes tipo 2, através da modulação do metabolismo lipídico, devido à diminuição dos factores de transcrição de NF-kB o que aumenta a actividade do PPAR (proliferador de peroxissoma) (Shidhu, 2003). Mais uma vez, parece que a ingestão de PUFA n-3 tem um efeito terapêutico no abaixamento dos níveis de TAG totais, e na prevenção de diabetes tipo 2, desempenhando um papel protector contra a peroxidação lipídica (Abuissa *et al* 2005; Doughman *et al*, 2007; Ramel *et al*, 2008; Shidhu, 2003).

Pelo que foi referido precedentemente fica evidente a importância nutricional do EPA e DHA, que se prende com a sua carência absoluta a nível do crescimento, reprodução e saúde em geral. Assim, quando há privação destes ácidos gordos na dieta humana, verifica-se uma diminuição do crescimento, desenvolvimento de dermatoses, danos renais e hepáticos, o que pode conseqüentemente conduzir à morte. Uma deficiência em ácidos gordos essenciais (LA e ALA) pode também causar alterações significativas no metabolismo, afectando a função das plaquetas, respostas inflamatórias e determinadas respostas imunes (Doughman *et al*, 2007; Schmitz e Ecker, 2008; Ward e Singh, 2005).

Apesar de toda a pesquisa clínica efectuada ao longo destes anos, ainda são necessários mais estudos nesta área.

1.2.4. Desvantagens associadas ao consumo de ácidos gordos PUFA n-3

Apesar dos evidentes benefícios associados ao consumo de ácidos gordos PUFA n-3 pormenorizadamente referidos é necessário, porém, ter em conta, que uma dose excessiva de ingestão de PUFA n-3 (doses diárias superiores a 3g/dia) parece ser responsável por distúrbios gastrointestinais, e por sua vez, doses extremamente elevadas (> 7 g/dia) de PUFA n-3 podem resultar em hemorragias internas (Conquer e Holub, 1996; Hooper et al, 2006). Estudos aferiram que quando o nível de PUFA n-6 na dieta é baixo (razão AA/EPA: 4:1) ocorre supressão de algumas respostas imunes, aumento dos níveis de colesterol ou ainda danos oxidativos no caso em que, coincidentemente, o nível de vitamina E é baixo (Schmitz, 1991). Assim, outros estudos apontem para a necessidade de, associado à ingestão de produtos alimentares com elevado teor em ácidos gordos n-3, devam ser, simultaneamente, ingeridas doses de α -tocoferol ou de vitamina E compatíveis (0,4mg a 0,6mg diárias), uma vez que este tipo de ácidos gordos tem um elevado grau de insaturação, o que os torna susceptíveis de sofrer peroxidação lipídica, levando conseqüentemente à libertação de radicais para o organismo (Conquer e Holub, 1996; Hooper et al, 2006).

1.2.5. Perfil lipídico da microalga *Diacronema vlkianum*

A microalga *Diacronema vlkianum* foi a espécie utilizada neste estudo, como fonte de incorporação de ácidos gordos. Esta espécie de microalga pertence ao Reino: Protista; Filo: Chrysophyta; Classe: Haptophyceae (ou Prymnesiophyceae); Ordem: Pavlovales; Família: Pavlovaceae; Género: *Diacronema* e encontra-se distribuída geograficamente nos mais variados locais, designadamente oceanos, *habitats* de água doce, entre outros (Volkman *et al*, 1997). Os microrganismos pertencentes a esta espécie são seres unicelulares compostos por células assimétricas que se reproduzem assexuadamente por divisão celular simples (Volkman *et al*, 1997). Organismos pertencentes à ordem Pavlovales, como é o caso da *Diacronema vlkianum* apresentam caracteristicamente na sua constituição esteróis como: 24-metil colest-5-en-3 β -ol (2,5%), 24-etilcolest-5-en-3 β -ol (15%), 24-etilcolest-5,22E-dien-3 β -ol (24,9%), 5 α -estanóis, 4 α -metilesteróis (26,6%) e outros esteróis menos comuns como 3,4-dihidroxi-4-metilesteróis (30,5%) (Donato *et al*, 2003; Gouveia *et al*, 2008). É ainda característico que microrganismos da classe Haptophyceae manifestem por norma um teor de ácidos gordos saturados total entre 30 a 40%, estando a fracção monoinsaturada compreendida entre 20 a 40%, e a fracção de polinsaturados variável entre 20 a 50% (Bandarra *et al*, 2002; Donato *et al*, 2003; Gouveia *et al*, 2008; Shifrin *et al*, 1981). Segundo Volkman *et al*. (1997), esta espécie de microalga pode apresentar a seguinte constituição de ácidos gordos: ácido mirístico-14:0 (14,4%), ácido palmitoléico 16:1 n-7 (14,9%), ácido estearidónico- 18:4 n-3 (13,2%) e EPA (27,1%), sendo ainda uma fonte de ácido palmítico - 16:0 (8,9%), ácido oleico - 18:1 n-9 (1,8%) e DHA (7,7%). Estas percentagens podem, todavia, ser alteradas, devido, aos condicionamentos do modo de cultura impostos, mas também devido à sua flexibilidade metabólica (Behrens e David, 1996; Volkman *et al*, 1997).

1.3. Microalgas como fonte de carotenóides

Cada espécie de microalga pode conter entre 5 a 10 tipos de carotenóides de um universo de aproximadamente 600 carotenóides diferentes (Donato *et al*, 2003; Derner *et al*, 2006; Plaza *et al*, 2009). Uma vez que o corpo humano não sintetiza carotenóides, a produção destes pigmentos através de culturas de microalgas tem elevado interesse no mercado de produtos farmacêuticos e nas aplicações alimentares destes produtos naturais (Mogedas *et al*, 2009; Ota *et al*, 2009). Este tipo de microrganismos é uma boa fonte biológica de uma grande diversidade de pigmentos, nomeadamente derivados de carotenóides com uma elevada utilização industrial em produtos alimentares e aditivos alimentares para aquacultura (Derner *et al*, 2006). A capacidade de produção de carotenóides pelas microalgas deve-se à capacidade fotossintética das mesmas. Neste processo ocorre absorção de luz solar o que resulta na

produção de energia. Esta é posteriormente transformada em dióxido de carbono, originando glúcidos e oxigénio. Como o oxigénio é facilmente convertido pela luz UV em espécies reactivas de oxigénio (ROS), as microalgas desenvolvem mecanismos de protecção que consistem na formação de compostos antioxidantes de forma a minimizar as concentrações de ROS geradas (Rodriguez-Garcia *et al*, 2008).

A biossíntese de espécies de carotenóides através das microalgas depende também da fase de crescimento, e sobretudo das condições ambientais impostas ao seu crescimento, como stress salino, temperatura, concentração de metais pesados, aumento da intensidade luminosa e acima de tudo a disponibilidade em azoto (Gouveia *et al*, 1996).

Para além da típica utilização de microalgas como aditivos alimentares ou como alimentos, algumas espécies de microalgas como é o caso da *Chlorella vulgaris* têm vindo a ser exploradas pela indústria farmacêutica como estimuladores da síntese de colagénio na pele, o que permite a regeneração dos tecidos (Spolaore *et al*, 2006).

Diversas espécies de microalgas revelaram ainda ser uma excelente fonte de carotenóides, em particular de β -caroteno, e por isso mesmo são uma promissora aplicação com propriedades antioxidantes (Henriques *et al*, 1998).

1.3.1. Carotenóides, propriedades gerais

Os carotenóides caracterizam-se por ter uma estrutura química com 40 átomos de carbono, que inclui uma cadeia principal de 9 ligações duplas conjugadas, flanqueadas por estruturas anelares de 6 carbonos nas extremidades (Perera e Yen, 2007; Rodriguez-Amaya, 2001). Estruturalmente, os carotenóides podem ser acíclicos (por exemplo: licopeno) ou conter um anel de seis carbonos numa das extremidades da molécula (por exemplo: β -caroteno) (Dias *et al*, 2009; Perera e Yen, 2007; Rodriguez-Amaya, 2001). A estrutura química típica dos carotenóides é responsável pela coloração (laranja, amarelo ou vermelho), presentes em alguns frutos, vegetais, fungos e flores, uma vez que as ligações duplas absorvem parte do espectro luminoso nelas incidentes (Del Campo, *et al*, 2007; Furr e Clark, 1997; Paiva e Russell, 1999; Perera e Yen, 2007; Rodriguez-Amaya, 2001).

Até 1992 identificaram-se cerca de 500 a 600 carotenóides diferentes em seres fotossintéticos e não fotossintéticos, como plantas superiores, algas, fungos e bactérias (Del Campo, *et al*, 2007; Perera e Yen, 2007; Quirós e Costa, 2006; Rao *et al*, 2010; Rodriguez-Amaya, 2001; Schimitz *et al*, 1991). Todavia, este valor foi já excedido com a identificação de novos pigmentos carotenóides em espécies marinhas. Estima-se que a produção de carotenóides totais na natureza seja de cerca 10^8 toneladas por ano, sendo maioritária a produção de 4 pigmentos: luteína, violaxantina, neoxantina e fucoxantina (Rodriguez- -Amaya, 2001; Schimitz *et al*, 1991).

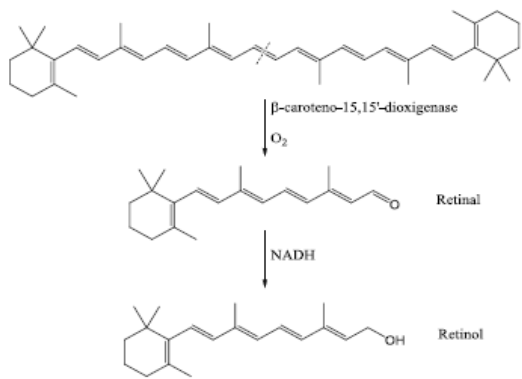


Figura 7- Metabolismo oxidativo do β -caroteno originando retinol (Vitamina A). A clivagem é realizada por uma dioxigenase dependente de oxigênio, adaptado de Tapiero *et al*, 2004

Apesar do reconhecimento científico dos benefícios para a saúde humana associados ao consumo de carotenóides, estes ainda não são considerados com nutrientes essenciais e como tal ainda não têm estipulado uma dose diária de ingestão recomendada (DDR) (Rao *et al*, 2007). No entanto, é desejável a incorporação deste tipo de pigmentos em diferentes alimentos, de modo a aumentar a sua ingestão diária.

1.3.2. Digestão, Absorção e Transporte de carotenóides

Uma vez que somente os microrganismos e as plantas são capazes de sintetizar carotenóides, a maioria das espécies animais obtém a fonte de carotenóides através da ingestão de vegetais ou frutos (Paiva e Russell, 1999; Vargas-Delgado *et al*, 2000). Cerca de 40 compostos diferentes de carotenóides (uma pequena quantidade representativa da totalidade de diferentes compostos de carotenóides) podem ser encontrados numa dieta humana típica (Vargas-Delgado *et al*, 2000). No entanto, desses cerca de 40 carotenóides, somente 20 foram identificados na corrente sanguínea e em alguns tecidos. Aproximadamente 90% dos carotenóides assimilados correspondia a: α -caroteno, β -caroteno, licopeno, luteína e criptoxantina (Paiva e Russell, 1999; Perera e Yen, 2007).

Esta família de pigmentos lipossolúveis, acumula-se maioritariamente no fígado, e em menor quantidade, nos rins, pele e órgãos genitais, e aproximadamente 10% permanece em circulação no plasma (Perera e Yen, 2007). Na pele acumula-se maioritariamente β -caroteno, luteína, licopeno e cantaxantina (Perera e Yen, 2007). A distribuição diferencial dos vários carotenóides nos tecidos é consequência da sua polaridade e também da repartição e troca entre lipoproteínas (Sohemy *et al*, 2002; Tourniaire *et al*, 2009).

Como os carotenóides apresentam propriedades lipídicas seguem a mesma via de absorção que os outros lípidos presentes na dieta, podendo os lípidos não digeridos que se encontram no lúmen intestinal, interferir com a absorção dos carotenóides sobretudo com carotenóides menos polares (Parker, 1996).

A absorção dos carotenóides engloba vários passos, desde a lise dos nutrientes e libertação dos carotenóides dos mesmos no lúmen do tracto gastrointestinal, à sua incorporação nas lipoproteínas (Furr e Clark, 1997; Perera e Yen, 2007). Num sentido lato, estes processos envolvem acções químicas e mecânicas de modo a tornar os alimentos assimiláveis. Após a lise

dos nutrientes, ocorre a dispersão em gotas lipídicas, solubilização em micelas biliares, passagem através das microvilosidades intestinais, absorção pelos enterócitos e incorporação em lipoproteínas, como demonstra a figura 8 (Furr e Clark, 1997; Parker, 1996).

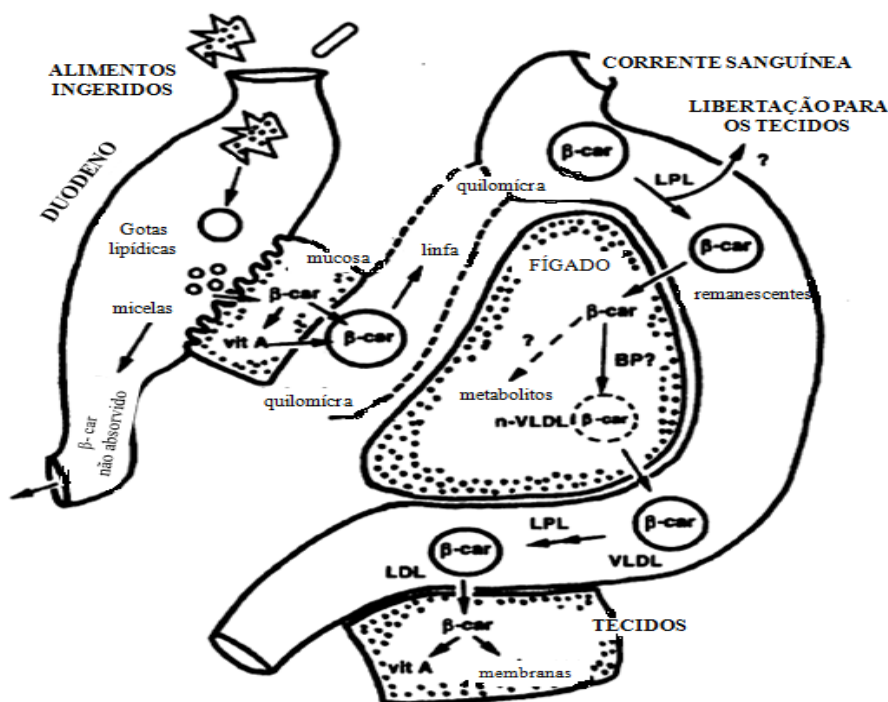


Figura 8- Mecanismos e vias envolvidas na absorção, transporte através do plasma e incorporação nos tecidos dos carotenóides, tomando como exemplo o β -caroteno, adaptado de Parker, 1996.

Após o processo de ingestão dos alimentos, ocorre a hidrólise gástrica no estômago, que resulta na libertação parcial de carotenóides, embora esta quantidade ainda não se encontre totalmente definida. Uma vez libertados para o estômago, os carotenóides lipofílicos dissolvem-se em gotículas lipídicas. São os movimentos contínuos do tracto intestinal que promovem a formação de uma fina emulsão lipídica (micelas) que atravessa o duodeno. A estrutura emulsificada possui uma camada mononuclear, polissacáridos e lípidos (Parker, 1996). Os carotenos são incorporados maioritariamente na zona mononuclear, enquanto o grupo das xantófilas se encontra mais à superfície da emulsão.

A incorporação das micelas representa um factor limitante na absorção dos carotenóides, quando ocorrem elevados níveis de ingestão destes pigmentos (ingestão superior a 20 mg), não se verificando esta limitação quando a ingestão é inferior (ingestão inferior a 10 mg) (Parker, 1996). O limite de saturação de absorção de carotenóides verifica-se para suplementações superiores 100mg, o que sugere, como referido anteriormente, uma baixa capacidade de incorporação micelar, ou uma capacidade limitada da translocação intracelular até à assimilação em quilomícra.

O local de incorporação na emulsão, tem particular importância, pois, os componentes que se encontram à superfície da emulsão são espontaneamente transferidos para estruturas

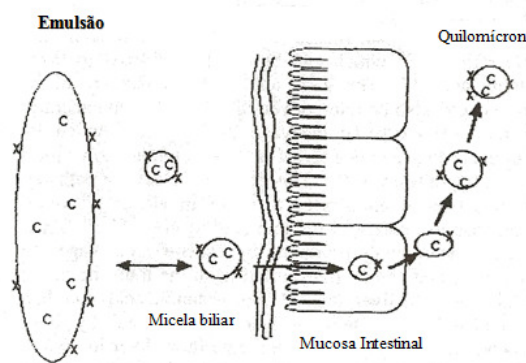


Figura 9- Esquema representativo da absorção intestinal dos carotenóides, adaptado de Furr e Clark, 1997.

micelares, enquanto os componentes presentes no núcleo requerem a digestão prévia. As xantófilas e os carotenos não polares, embora com mais dificuldade, difundem-se por difusão passiva através da superfície das microvilosidades intestinais (figura 9). A taxa de difusão é determinada consoante a concentração entre as micelas e as membranas dos enterócitos (Furr e Clark, 1997; Parker, 1996; Perera e Yen, 2007).

O transporte dos carotenóides no plasma é mediado por lipoproteínas. A distribuição dos carotenóides nas lipoproteínas é feita segundo as suas características físicas (polaridade) e a composição lipídica das lipoproteínas. Assim, o β -caroteno encontra-se maioritariamente nas LDL (58-73%) e em menor quantidade nas HDL (17-26%) e VLDL (10-16%). Contrariamente, a luteína e a zeaxantina estão localizadas predominantemente nas HDL (53%) e em menores percentagens nas LDL (31%) e VLDL (16%) (Parker, 1996).

Finalmente, os quilomícra formados na mucosa do intestino são transportados pelo sistema linfático até á corrente sanguínea onde são conduzidos através da veia porta até ao fígado e tecido adiposo. É no fígado que ocorre a redistribuição de carotenóides para outras partes do corpo, apesar de não se encontrar totalmente esclarecido o seu processamento (Furr e Clark, 1997; Parker, 1996; Schmitz *et al*, 1991). Até à data, o fígado e o tecido adiposo revelaram ser os locais de maior incorporação de concentração de carotenóides. A acumulação de carotenóides nos tecidos encontra-se também relacionada com a sua função específica nesse tecido (Schmitz *et al*, 1991; Yeum e Russell, 2002).

1.3.3. Benefícios da incorporação de carotenóides na dieta

Existem uma panóplia de benefícios associados à ingestão de carotenóides. É bem conhecido o papel antioxidante dos carotenóides na protecção cutânea contra irradiação UV (ultra-violeta). O tipo de lesões provocadas por radiação UV afecta em particular, lípidos celulares, proteínas e ADN, o que potencia a formação de eritemas, envelhecimento precoce da pele, fotodermatose e em casos de exposição mais aguda o desenvolvimento de cancro de pele (Chong *et al*, 2007; Perera e Yen, 2007; Tapiero *et al*, 2004). Alguns estudos *in vitro* demonstraram que os carotenóides previnem este tipo de lesões, como evidenciado na figura 10,

pela capacidade de captação de ROS, o que faz diminuir a sua concentração no plasma e nos



Figura 10- Intervenção dos carotenóides na prevenção do aparecimento de ROS, adaptado de Rao *et al*, 2007.

tecidos mediante o contacto com a luz UV (Dixon *et al*, 1998; Perera e Yen, 2007; Rao *et al*, 2007). Também, a capacidade dos carotenóides na protecção das membranas lípidicas contra a peroxidação lipídica dos ROS se deve ao seu papel antioxidante. Daí que, a não ingestão de carotenóides comprometa a susceptibilidade para lesões oxidativas nos tecidos (Dixon *et al*, 1998; Perera e Yen, 2007; Rao *et al*, 2007; Rodriguez-Amaya, 2001; Schmitz *et al*, 1991). Para actuarem como antioxidantes é necessário que estes pigmentos sejam incorporados nos tecidos

no local específico numa concentração suficiente para permitir a protecção das moléculas após redução dos (ROS Perera e Yen, 2007).

A capacidade dos carotenóides na eliminação do oxigénio singleto (figura 11) encontra-se relacionada com o sistema de ligações duplas (Rodriguez-Amaya, 2001). Embora, se encontre demonstrado em estudos *in vitro* a capacidade antioxidante dos carotenóides, *in vivo* este mecanismo ainda não se encontra totalmente esclarecido. Tal deve-se sobretudo à baixa concentração de carotenóides nos tecidos humanos face às concentrações utilizadas nos estudos *in vitro* (Rodriguez-Amaya, 2001). Para além das propriedades antioxidantes conferidas pelos carotenóides, o seu consumo é essencial para a saúde por outras razões, nomeadamente, devido ao papel desempenhado como pró-vitamina A (Rodriguez-Amaya, 2001).

No caso da visão, os carotenóides actuam como protectores da mácula quando exposta a processos foto-oxidativos, evitando assim a degradação da mácula lútea da retina (Chong *et al*, 2007; Perera e Yen, 2007; Tapiero *et al*, 2004).

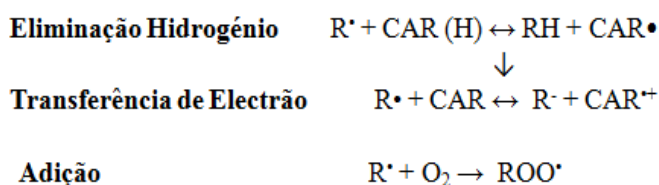


Figura 11- Modelo esquemático de eliminação de ROS pelos carotenóides (CAR), adaptado de Perera e Yen, 2007.

Os carotenóides desempenham ainda um papel preponderante a nível do sistema imunitário. Em primeiro lugar, actuam contra os agentes patogénicos, uma vez que, a activação do sistema imunitário, acciona a activação de neutrófilos que por sua vez, conduzem à produção de ROS em proporções consideráveis. Durante o processo inflamatório, a interacção com

mediadores pró-inflamatórios, productos de origem bacteriana e receptores específicos, desencadeia a activação de fagócitos o que resulta na libertação do enzima NADPH, responsável pela produção de grandes quantidades de radicais superóxido (O^2^-). Consequentemente, a existência de metabolitos reactivos de oxigénio, e activação de neutrófilos e monócitos, conduzem à libertação para o espaço intracelular do enzima mieloperoxidase (MPO). Este enzima é responsável pela oxidação de Cl^- existente no espaço intercelular, originando ácido hipocloroso (HClO), nefasto para o organismo (Perera e Yen, 2007; Tapiero *et al*, 2004). As substâncias produzidas na sequência da resposta imunitária possuem um elevado poder oxidante, podendo reagir com uma enorme gama de compostos biológicos, como sulfidrilos, PUFA (existentes nas membranas das células imunitárias), ADN, nucleótidos de piridina, aminoácidos aromáticos alifáticos e compostos azotados (Perera e Yen, 2007; Tapiero *et al*, 2004).

Além da toxicidade directa associada aos agentes oxidantes derivados na consequência da resposta imune, estes podem ainda indirectamente induzir a desregulação do equilíbrio protease / antiprotease existente da parede intestinal. Deste modo, a inactivação oxidativa de importantes inibidores da protease em conjunto com a activação oxidativa de proteases latentes, gera um ambiente favorável que contribui para a degradação da matriz intersticial, assim como a lesão das células epiteliais (Perera e Yen, 2007; Tapiero *et al*, 2004). De referir ainda que as células imunitárias são sensíveis à existência de ROS externos, pois contêm elevados níveis de vitaminas antioxidantes que, presumivelmente, fornecem protecção contra a peroxidação lipídica e imunossupressão, estando ambos os processos associados a um risco relacionado com o alto teor em PUFA (Brambilla *et al*, 2008; Perera e Yen, 2007; Tapiero *et al*, 2004). Estudos anteriores demonstraram a relevância da incorporação de vitaminas e carotenóides, uma vez que a sua ausência pode desencadear a supressão das funções imunitárias, o que afecta a resposta imunitária mediada por células T e a resposta mediada por células B (Brambilla *et al*, 2008; Schmitz, 1991).

Pelo que foi referido anteriormente, é simples depreender a importância dos carotenóides e sua relação com a prevenção cardiovascular. Ao longo dos anos, diversas investigações têm vindo a sugerir que as doenças cardiovasculares são resultado de processos contínuos que incluem processos de stress oxidativo, disfunção endotelial, inflamação e remodelação vascular, estando as disfunções endoteliais, relacionadas em grande escala com o desequilíbrio homeostático entre o monóxido de azoto e ROS, como o anião superóxido e o peróxido de hidrogénio. Por sua vez, o stress oxidativo originado por ROS desencadeia a produção de LDL oxidadas. Este aumento exacerbado de LDL encontra-se directamente relacionado com a patogénese da aterosclerose, doença, que em muito casos origina ataque cardíaco ou isquémia do miocárdio (Paiva e Russell, 1999; Perera e Yen, 2007; Riccioni, 2009; Rodriguez-Amaya, 2001). Um estudo realizado pela Universidade de Harvard, no qual

participaram 39 876 mulheres, evidenciou que a elevada concentração de licopeno e β -caroteno no plasma se encontrava associada ao menor risco de incidência cardiovascular. Este estudo encontra-se de acordo com o sugerido pela comunidade científica sobre o benefício no consumo de carotenóides para a prevenção de doenças cardiovasculares (Perera e Yen, 2007; Riccioni, 2009; Stahl e Sies, 1996).

O estudo da ingestão de carotenóides mostrou concomitantemente os seus efeitos hepatoprotectores (Murthy *et al* 2005). As funções desempenhadas pelo fígado, ou seja a produção de energia através da oxidação lipídica, desintoxicação, destruição de bactérias patogénicas, vírus e hemácias em fim de vida, entre outras reacções constantes do seu catabolismo e anabolismo, proporcionam a libertação de radicais e produtos de oxidação para o organismo, e como tal é necessário que existam em simultâneo, mecanismos de protecção contra este tipo de lesões oxidativas (Guerin *et al*, 2003; Kim *et al*, 2009; Murthy *et al* 2005). Ensaio anteriormente efectuados, evidenciaram que os extractos de microalgas da espécie *Chlorella vulgaris* conferiam um efeito hepatoprotector em ratinhos com lesões hepáticas induzidas por CCL₄, com consequente diminuição dos níveis serológicos dos enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e da lesão tecidual (Kim *et al*, 2009). Um estudo desenvolvido por Murthy *et al*. (2005) revelou que o efeito hepatoprotector se deve em parte à presença de carotenóides, visto que os carotenóides obtidos através da suplementação tinham maior efeito anti-hepatotóxico em ratinhos com lesão hepática induzida por CCl₄, do que o β -caroteno sintético ou β -caroteno isolado de uma outra fonte natural (Murthy *et al* 2005). Outros estudos apontam ainda para a protecção que os carotenóides conferem às células intactas (por exemplo, as células hepáticas humanas HepG2) contra a peroxidação oxidativa de lípidos (Paiva e Russell, 1999).

O consumo de carotenóides parece simultaneamente estimular a comunicação intercelular através das junções comunicantes. A participação destas biomoléculas nas junções comunicantes são de particular interesse, assim como a participação na fluidez das membranas, papel estrutural e propriedades de permeabilidade das mesmas, desempenhando principalmente, um papel protector contra a deteioração das membranas. Os carotenos funcionam ainda como receptores celulares, transportadores enzimáticos, actuam nos processos regulatórios e na transdução de sinais, pelo que a presença/ausência de carotenóides na membrana afecta putativamente o funcionamento dos sistemas acima referidos, afectando também a transferência de electrões ao longo da cadeia oxidativa (Baker, 2004; Britfon, 1995; Chen *et al*, 1998; Dixon *et al*, 1998; Paiva e Russell, 1999; Stahl e Sies, 1996).

O estudo do metabolismo dos carotenóides em Humanos é de extrema importância, como foi sendo referido, pela sua associação à diminuição do risco de determinados tipos de cancro, na prevenção de úlceras gástricas e CVD, na estimulação do sistema imunitário e ainda na protecção da degeneração da mácula (Paiva e Russell, 1999; Perera e Yen, 2007).

É fundamental ter ainda em consideração que o estudo dos carotenóides em modelos animais é limitativo, porque a maioria dos animais não absorve ou metaboliza estes compostos do mesmo modo que os humanos.

Em 2007, o *Expert Group on Vitamins and Minerals* (EVM), determinou um limite máximo seguro para os suplementos de β -caroteno em 7 mg/dia (Strobel *et al*, 2007).

Em suma, os carotenóides são compostos de elevada importância na dieta, não só como precursores de Vitamina A, mas também como protectores da função celular mediante o seu a função

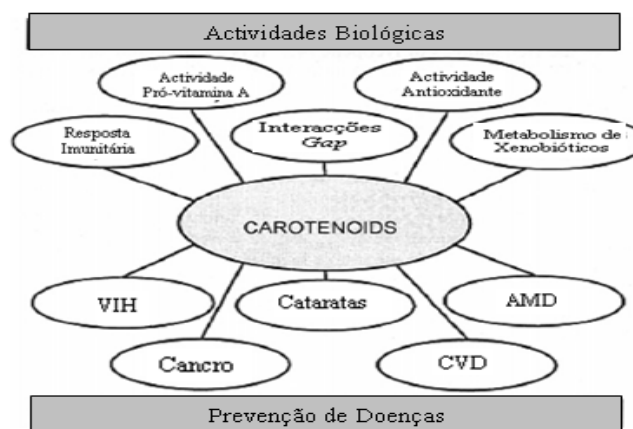


Figura 12- Diferentes doenças, nas quais os carotenóides desempenham papéis importantes, adaptado de Rao *et al*, 2007.

desempenhada como quelante de oxigénio singlete, como descrito *a priori* e agora esquematizado na figura 12.

1.3.4. Desvantagens associadas ao consumo de carotenóides

Embora existam imensos benefícios associados à incorporação de carotenóides na dieta, como anteriormente referido, algumas fontes sugerem efeitos adversos relativos a uma suplementação com doses elevadas de β -caroteno (Paiva e Russel, 1999). Tal deve-se ao facto dos suplementos de β -caroteno ou outro tipo de carotenóides em condições de elevado stress oxidativo sofrerem degradação oxidativa, o que origina elevadas quantidades de produtos de degradação com propriedades pró-oxidantes, como é o caso de compostos carbonílicos e epóxidos, altamente reactivos e que podem exercer efeitos adversos na saúde. Um desses possíveis mecanismos encontra-se exemplificado na figura 13 (Siems *et al*, 2005).

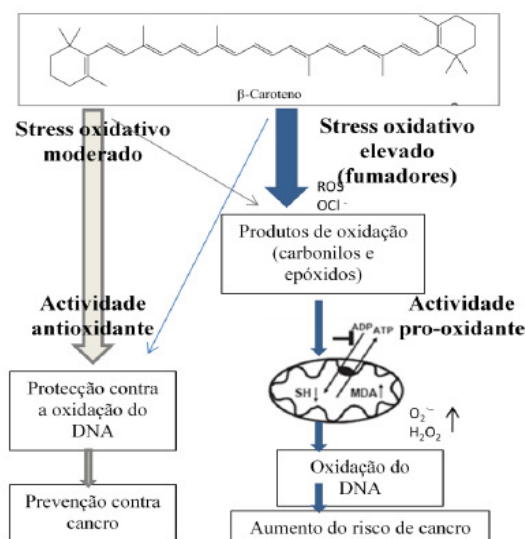


Figura 13- Esquema síntese da dualidade dos efeitos antioxidantes e pró-oxidantes do β -caroteno, adaptado de Siems *et al*, 2005.

Este mecanismo revela que sob circunstâncias de stress oxidativo moderado, o efeito antioxidante do β -caroteno prevalece. Contudo, em condições de elevado stress oxidativo,

podem ocorrer reacções adversas como: desemparelhamento de translocase do nucleótido de adenina, oxidação do grupo sulfidriolo, redução dos níveis de glutatona e acumulação de malonaldeído (MDA). Assim, o aumento dos níveis de ROS após a inibição do metabolismo energético, em particular, de radicais de aniões superóxido e peróxido de hidrogénio pode causar distúrbios nas moléculas vizinhas (proteínas e ácidos nucleicos), potenciando o desenvolvimento de cancro. Esta explicação é plausível para a compreensão do aumento da prevalência de cancro de pulmão em fumadores que ingerem doses elevadas de suplementos carotenóides (Siems *et al*, 2005).

Enquanto os mecanismos biológicos dos carotenóides não forem totalmente esclarecidos, de modo a evitar efeitos adversos de uma dose tóxica, os suplementos dietéticos devem, ser utilizados segundo as doses de substituição indicadas por entidades competentes (Thomas, 2006).

1.3.5. Perfil da *Chlorella vulgaris* em carotenóides

A espécie de microalga *Chlorella vulgaris* (alga verde unicelular) pertence ao Reino: Protista, Filo: Chlorophyta, Classe: Chlorophyceae, Ordem: Chlorococcales, Família: Oocystaceae, e Género: *Chlorella*. Este tipo de microrganismos eucarióticas unicelulares, prevalecem maioritariamente em água fria (Lee *et al*, 2010).

Nos anos 40, a espécie *Chlorella vulgaris* começou a ser investigada do ponto de vista nutricional, por ser uma promissora fonte de proteínas, lípidos, glúcidos, vitaminas e minerais (Day *et al*, 2009; Lee *et al*, 2010). Como pertence à Classe Chlorophyceae, a espécie *Chlorella vulgaris* apresenta uma composição rica em carotenóides, nomeadamente α e β -caroteno, neoxantina, luteína, violaxantina e zeaxantina, que se encontram incorporados nas lamelas dos cloroplastos. Na sua constituição é ainda possível quantificar carotenóides como cantaxantina e astaxantina. No entanto, a composição de carotenóides nesta espécie, pode variar consoante as condições impostas durante a carotenogénese, como stress salino, o que determina posteriormente o aspecto e características espectrais da microalga (Gouveia *et al*, 1996; Lee *et al*, 2010).

Estudos da administração da *Chlorella vulgaris* em animais demonstraram efeitos benignos a nível de inúmeras funções bioquímicas, tais como efeito antioxidante e diminuição dos níveis de glucose em ratinhos diabéticos (Kim *et al*, 2009; Murthy. *et al*, 2005) Estudos realizados em coelhos revelaram até melhoramentos na actividade anti-inflamatória e diminuição dos níveis de colesterol após suplementação com *Chlorella vulgaris* (Lee *et al*, 2010).

Os potenciais benefícios associados ao consumo de *Chlorella vulgaris* na variante laranja são actualmente atribuídos à sua composição em minerais, fibras, clorofilas e a um vasto

espectro de antioxidantes como são o caso dos carotenóides (Day *et al*, 2009; Lee *et al*, 2010). Assim sendo, pelo que já foi referido anteriormente, a escolha da microalga como fonte de carotenóides recaiu precisamente na *Chlorella vulgaris*.

2. OBJECTIVOS

O presente trabalho tem como objectivo principal a avaliação das potencialidades da introdução na dieta humana de microalgas, nomeadamente a *Diacronema vlkianum* para o estudo da incorporação e biodisponibilidade de ácidos gordos n-3 e n-6 e *Chorella vulgaris* na sua variante laranja, para um estudo de biodisponibilidade em carotenóides. Deste modo, o estudo foi delineado com modelos animais (ratinhos *Wistar*) nos quais foram efectuados testes de toxicidade às respectivas microalgas, seguindo-se a determinação da incorporação das biomoléculas (ácidos gordos e carotenóides) durante um determinado período de tempo (2 meses relativamente ao estudo de ácidos gordos e 1 mês para o estudo de carotenóides).

Os benefícios associados à suplementação com *Diacronema vlkianum* foram avaliados tendo em conta a concentração de ácidos gordos n-3 nomeadamente EPA e DHA, devido aos seus conhecidos efeitos na saúde a longo prazo e respectiva razão $\Sigma n-3/\Sigma n-6$, nos diferentes órgãos e tecidos (eritrócitos, fígado, rim, coração, gordura visceral e gordura subcutânea) recolhidos ao longo das diferentes etapas do estudo, com o intuito de avaliar, não só os seus efeitos imediatos mas também os efeitos a longo prazo. A fim de determinar a biodisponibilidade/bioincorporação foi ainda avaliada a percentagem destes compostos contidos nas amostras fecais.

Relativamente ao estudo da introdução de microalga *Chlorella vulgaris* na sua variante laranja como suplemento de carotenóides na dieta, recorreu-se à estimação da biodisponibilidade destes compostos nos diversos órgãos recolhidos (fígado, coração, rim, intestino, gordura visceral e gordura subcutânea). Simultaneamente, foi avaliado, mediante a análise fecal, a taxa de excreção de carotenóides nos dias iniciais, intermediários e finais do respectivo estudo. Este passo envolveu a optimização do método correspondente à extracção de carotenóides dos compostos em causa, visto ainda não se encontrar estabelecido na literatura um método de referência.

Finalmente, tendo em conta as informações recolhidas ao longo do estudo, um dos objectivos passou pela divulgação dos benefícios para a saúde humana da introdução das respectivas microalgas na alimentação humana.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento, material e características gerais do estudo

A primeira parte do estudo conforme se encontra descrito na secção 3.2. foi relativa à suplementação durante 2 meses com a microalga *Diacronema vlkianum*. O delineamento da suplementação com *Chlorella vulgaris* é referido em detalhe na secção 3.3.

- Em ambos os estudos os modelos animais utilizados (ratinhos *Wistar* do sexo masculino) foram colocados em gaiolas individuais abastecidas devidamente com um pouco de serradura. As gaiolas foram colocadas em local fechado em condições de temperatura variáveis entre 22°C-24°C, com uma humidade relativa (85%) e de ciclos de luminosidade controladas (ciclo de luz/escuro de 12horas). Foi fornecida ração e água *ad-libitum* a cada ratinho.

- O manuseamento dos animais respeitou todas as normas internacionais de ética para o tratamento de animais de laboratório. No final das respectivas fases de suplementação, os ratinhos foram sacrificados após a administração via intraperitoneal de uma solução de Uretano a 26% numa dose equivalente a 390 mg/kg (16,6ml/kg).

- A microalga *Diacronema vlkianum* foi produzida no INRB, I.P./L-IPIMAR. A sua cultura realizou-se em sacos de polietileno (100 L), devidamente enriquecidos com água salgada esterilizada e meios de cultura Wallerstein e Miquel (3:1). Os bioreactores foram mantidos a baixa exposição luminosa e a uma temperatura variável entre 18°C a 26°C. Na fase final de crescimento a microalga foi recolhida, centrifugada e liofilizada.

- A *Chlorella vulgaris* na variante laranja foi cedida pelo Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, I.P. (INETI) e mantida a -20°C até à sua utilização. O cultivo desta microalga foi feito em meios de crescimento apropriados (Vonshack, 1986) a uma temperatura de 25°C e exposto a luminosidade reduzida. Após a produção de biomassa, induziram-se aos meios de cultura condições de stress salino (adição de NaCl (30%) e privação de azoto). A biomassa microalgal foi finalmente recolhida por centrifugação e liofilização.

- A administração diária das respectivas microalgas foi efectuada por sonda nasofágica, após a preparação de uma suspensão aquosa das mesmas. A cada ratinho foi então administrado diariamente durante o tempo de suplementação respectivo cerca de 3 mL do preparado correspondente.

3.2. Delineamento do estudo da suplementação com *Diacronema vlkianum*

A aferição dos benefícios na saúde humana resultante da incorporação da microalga *Diacronema vlkianum* foi delineada com 34 ratinhos (*Wistar*), todos do sexo masculino e com um peso médio de 300g \pm 15,9 (figura 14). 16 ratinhos serviram de controlo (n=4 sacrificados ao

fim de 15 dias; n=6 sacrificados ao fim de 1 mês e n= 6 sacrificados ao fim de 2 meses), não tendo sido alvo de suplementação. Nos restantes 18 ratinhos (n=4 sacrificados ao fim de 1 semana, n=7 sacrificados ao fim de 1 mês e n=7 sacrificados ao fim de 2 meses) houve suplementação numa suspensão com água e com microalga na proporção diária de 1,25g de *Diacronema vlkianum*/ kg / dia, o equivalente à administração de 500mg de EPA+ DHA diariamente, o que se encontra de acordo com o estabelecido pela *International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids* (ISSFAL, 2004), para a manutenção da saúde cardiovascular.

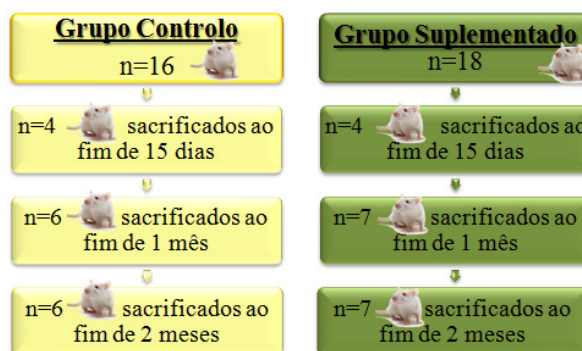


Figura 14- Esquema representativo do delineamento experimental do grupo suplementado com *Diacronema vlkianum* e respectivo grupo controlo.

3.2.1. Extração de ácidos gordos nas amostras

Foram estabelecidas determinações da composição de ácidos gordos em amostras biológicas em 4 passos principais: extração lipídica, isolamento dos componentes lipídicos, derivatização para volatilizar os compostos e respectiva análise por GC (Cromatografia Gás-Líquido).

O método descrito por Lepage e Roy (1986), sujeito a ligeiras adaptações foi o utilizado para extração dos ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME) das amostras a analisar. Assim, as amostras recolhidas ao longo do estudo (15 dias, 1 mês, 2 meses) de coração, fígado, rim, gordura visceral e gordura subcutânea foram liofilizadas durante 24 horas num liofilizador (Heto Power Dry LL3000, República Checa) a uma temperatura de -80°C. A liofilização das amostras foi efectuada, uma vez que estas se encontravam congeladas. Este processo permite assim a rápida sublimação da água solidificada como consequência do elevado vácuo.

Após a liofilização foram pesados aproximadamente 300 mg (balança: Mettler AT201 FACT, d=0,01mg, Suíça), dos respectivos órgãos e das amostras fecais recolhidas, à excepção das amostras de gordura em que se pesaram 150mg. Este material foi de seguida transferido para tubos de 15mL de capacidade, munidos de rosca. Efectuou-se ainda a análise em duplicado de uma amostra de microalga *Diacronema vlkianum*, a fim de se poder inferir sobre o seu perfil em ácidos gordos, assim como a análise em duplicado de amostras da ração consumida pelos

ratinhos ao longo do estudo. A cada tubo foram adicionados 5mL de solução de cloreto de acetilo e metanol a 5% (1:19) com adição de 100µL de padrão interno (21:0). O uso da mistura de cloreto de acetilo e metanol a 5% na razão 1:19 permite como explicado anteriormente a extracção dos lípidos da membrana das amostras.

Os tubos foram seguidamente agitados no vortéx (Reax Control da Heidolph, Alemanha) durante 30 segundos e posteriormente colocados em Banho-Maria (modelo 3047, Kotterman, Alemanha) a 80°C durante 1 hora. Depois de arrefecidas as amostras à temperatura ambiente, adicionou-se a cada tubo 1 mL de água Mili-Q e 2 mL de *n*-hexano, agitando-se novamente cada tubo durante 30 segundos no vortéx, de modo a promover a separação de fases. Como esta mistura forma uma única fase miscível, a adição de água e *n*-hexano, funciona na separação da mistura resultando na formação de 2 fases: uma fase inferior- metanol/água e uma fase superior – *n*-hexano, onde se encontram os lípidos extraídos dos tecidos.

A fim de facilitar a separação da fase orgânica da fase aquosa, foi efectuada a centrifugação das amostras durante 5 min a 2300g (centrífuga: sigma, B. Braun, Alemanha). Cada fase orgânica respectiva (fase superior) foi recolhida e filtrada através de uma coluna com algodão e sulfato de sódio anidro para um vial de GC de âmbar devidamente identificado. Em algumas amostras, dada à pouca concentração de ésteres metílicos foi necessário transferi-las para “inserts” (redutores de volume).

Antes de injectadas no cromatógrafo, as amostras foram primeiramente concentradas, num evaporador de azoto (Pierce Reacti-ThermIII, Alemanha), durante aproximadamente 10 minutos e ressuspendidas em 200µL de *n*-hexano.

Todos os reagentes utilizados referidos precedentemente são da marca Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha) com grau de pureza *p.a.* (para análise).

3.2.2. Análise da presença de ácidos gordos nas amostras por GC-FID

A técnica mais usual para determinação qualitativa e quantitativa de ácidos gordos é a Cromatografia Gás-Líquido. O uso de colunas polares permite a separação dos FAME de acordo com o seu ponto de ebulição e a polaridade. Em geral cadeias de ácidos gordos mais curtas e com menor número de ligações duplas eluem primeiro lugar. A acoplação da técnica de GC a um detector de ionização de chama oferece uma melhor optimização das condições de operação, o que aumenta o intervalo linear possibilitando a obtenção de bons resultados quantitativos (Nelson e Cox, 2005).

Os FAME foram então separados e quantificados por análise cromatográfica realizada por injeção automática de 20µL de amostra no cromatógrafo gás-líquido CP-3800 com FID (Varian Inc., Estados Unidos Da América (EUA)) – (figura 15) equipado com um detector de ionização de chama.

A separação foi efectuada numa coluna capilar de sílica fundida DB-WAX (Agilent J&W Scientific, EUA) com um filme de polietilenoglicol, 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura de filme (30 mX, 0.25 mm ID, X0.25µm), utilizando hélio como gás de arrastamento. As temperaturas do injector e detector foram mantidas constantes ao longo da análise a 250°C, durante os cerca de 40 minutos de análise. A coluna capilar por sua vez foi aquecida a 180°C durante 5 min, sofrendo um aumento gradual de 4°C/min até atingir os 220°C, temperatura que foi mantida durante os 25 min de cada corrida. No final de cada análise a coluna foi aquecida até 240°C a uma velocidade de 20°C/min e mantida a 240°C durante 15 min (programa de limpeza).



Figura 15- GC- FID, Agilent J&W Scientific. EUA.

As áreas dos picos foram obtidas recorrendo a um software da Varian e os valores expressos em percentagem do total da resposta não corrigida do detector. Os ésteres metílicos presentes na amostra foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões individuais de ésteres metílicos (padrão PUFA 3) fornecidos pela Sigma (St. Louis, EUA).

A análise quantitativa por GC-FID basea-se na relação entre a massa dos carbonos “efectivos” (átomos de carbono das unidades de metileno, que no caso dos FAME correspondem a todos os carbonos, à excepção do carbono do grupo carboxílico) e da resposta do detector. A quantificação do ácido gordo é então efectuada com base na comparação da sua área com a área do padrão interno de concentração conhecido. Deste modo, sendo possível por este método estabelecer a percentagem relativa das áreas de cada ácido gordo em comparação com o total de ácidos gordos na amostra. O cálculo da percentagem associada a cada ácido gordo foi feito de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ acg} = (A_{\text{acg}} \times 100) / (A_{\text{total}} - A_{\text{pi}})$$

Legenda:

- | | |
|--|--|
| % acg : percentagem relativa de ácido gordo | A_{acg} : área ácido gordo |
| M_{pi} : Massa do padrão interno (mg) | A_{pi} : Área do padrão interno |
| A_{total} : Somatório das áreas de todos os ácidos gordos | |

3.3. Delineamento do estudo da suplementação em *Chlorella vulgaris* na variante laranja

Quanto à suplementação com carotenóides na dieta, foi utilizada uma população de 19 ratinhos *Wistar* machos com pesos corporais médios de $304,9 \pm 13,6$ g. (figura 16) Formaram-se 2 grupos, um grupo controlo (n=3 sacrificados ao fim de 1 semana e n=5 sacrificados ao fim de 1 mês) aos quais se administrou diariamente água *per os* e um grupo (n=5 sacrificados ao fim de 1 semana e n=6 sacrificados ao fim de 1 mês) suplementado diariamente com uma dose diária de 1,38g/kg da microalga *Chlorella vulgaris* (laranja), o equivalente a uma dose de carotenóides de 1,71mg/kg/dia, (aproximadamente 1,6 vezes superior à dose máxima de β -caroteno indicada pela FSA (UK, *Food Standards Agency*) -7mg/dia), sob a forma de suspensão aquosa *per os*. Esta conversão foi determinada com a respectiva aplicação de factores de conversão de doses animal/homem com base na massa corporal (Guidance for Industry, FDA, Julho de 2005).

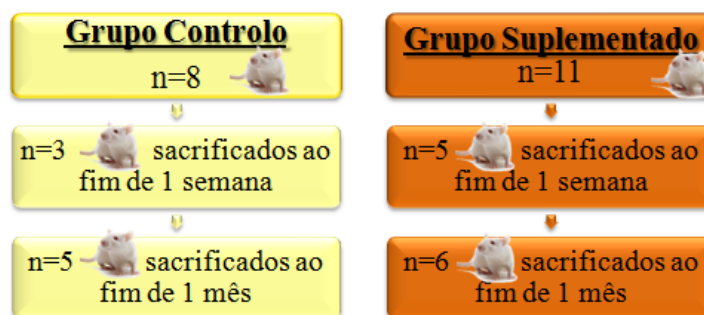


Figura 16- Esquema representativo do delineamento experimental do grupo suplementado com *Chlorella vulgaris* e respectivo grupo controlo.

3.3.1. Determinação dos carotenóides totais na *Chlorella vulgaris* na sua variante laranja

O método de determinação de carotenóides totais foi adaptado e baseado de Gouveia *et al.* (1996). Deste modo, pesaram-se 10 mg de material liofilizado de *Chlorella vulgaris* em duplicado para tubos de vidro de 18 mL munidos de rosca, aos quais se adicionaram posteriormente 5 mL de acetona. A amostra foi depois sujeita a homogenização num homogenizador (Polytron PT 3100 D, Suíça) a 9300 rpm durante 2 minutos. Finda a homogenização, as amostras foram colocados num banho de ultrasons (Transsonic T570/H (ELM) Alemanha), durante 10 minutos. Findo o banho de ultrasons as preparações foram novamente sujeitas a agitação, realizada num vórtex durante cerca de 2 minutos. Seguiu-se uma centrifugação a 2100 g realizada durante 10 min. Após a centrifugação recolheu-se o sobrenadante que serviu para a determinação de carotenóides totais. A determinação de carotenóides totais foi realizada a 475nm num espectrofotômetro UV/vísivel (UNICAN, Alemanha).

3.3.2. Extracção de carotenóides das amostras

A extracção de carotenóides nas amostras de órgãos recolhidos (rim, fígado, coração, intestina, gordura visceral e gordura subcutânea) após o sacrifício dos ratinhos ao fim de 1 mês, da ração, da microalga *Chlorella vulgaris* e das amostras fecais recolhidas diariamente foi feita segundo o método de Prates *et al*, 2006 sujeito a ligeiras adaptações.

A determinação de carotenóides segundo este método procedeu-se em duplicado para amostras de *Chlorella vulgaris*, ração consumida e amostras fecais. Pesaram-se então 75 mg de cada amostra previamente liofilizada e devidamente moída para tubos de vidro 18 mL de capacidade munidos de rosca. Seguidamente, adicionaram-se cerca de 0,20g de ácido ascórbico e BHT e 5,5 mL de solução de saponificação- solução extemporânea em que se dissolveu KOH *p.a.* na percentagem de 11% (w/v) em etanol absoluto *p.a.* 55% (v/v) e água destilada 45% (v/v). Os tubos foram de imediato sujeitos a agitação, com o intuito de evitar aglomeração dos fragmentos da amostra. O ar dos tubos foi substituído por azoto, e rolhados de seguida, de modo a evitar possíveis contactos com oxigénio, que pudesse causar degradação da amostra. Mais uma vez, os tubos agora rolhados foram agitados até dissolver completamente o ácido ascórbico, e de seguida aquecidos num banho Maria a 80°C durante 15 minutos, com agitação a 200 rpm. Retirados do aquecimento, foram arrefecidos em água fria durante 1 minuto (<50°C). Seguidamente adicionaram-se 2 mL de água destilada, 3 mL de *n*-hexano, agitando-se vigorosamente no vórtex durante 2 min. Na fase final as preparações foram centrifugadas a 2000g durante 5 min. Finda a centrifugação, as fases superiores (*n*-hexano) foram aspiradas para tubos pequenos com tampa. Adicionou-se sulfato de sódio anidro para os tubos pequenos que se agitaram no vórtex durante 10 segundos. Finalmente, filtrou-se uma alíquota das fases do *n*-hexano (superiores) com recurso a seringas equipadas com filtros 0,22µm, para frascos de âmbar de 1,5mL, para posterior injeção no HPLC.

Durante todo o procedimento laboratorial, o manuseamento das amostras foi efectuado de modo a conferir reprodutibilidade ao ensaio, assim como as manipulações foram efectuadas com a mínima exposição directa à luz solar e colocados em viais de âmbar devido à sensibilidade das espécies de carotenóides.

3.3.3. Análise da presença de carotenóides nas amostras por HPLC

A técnica de HPLC, é uma técnica cromatográfica que se distingue das demais porque a fase móvel se encontra a alta pressão. O uso de elevadas pressões permite uma redução no diâmetro das partículas da fase estacionária, localizada no interior da coluna cromatográfica. Os compostos a analisar são então separados de acordo com a polaridade e interação respectiva com a fase estacionária (Rodríguez-Amaya, 2001). O HPLC (Agilent 1110 Series – Agilent

Technologies Inc., Palo Alto, CA, EUA) utilizado para determinação de carotenóides era composto por uma bomba quaternária G1311A, desgaseificador G1322A, forno termostático G1316A, auto-injector com arrefecimento G1313A e detector UV G1315B (figura 18). A análise foi efectuada com uma coluna C18 de fase reversa: Phenomenex 250 x 4,60nm ID e com tamanho de partículas de 5µm. (Gemini 5UC18 110 EUA), mantida a 20°C durante as determinações. A fase móvel



Figura 17- HPLC Agilent 1110, EUA.

utilizada foi uma mistura de acetonitrilo: acetato de etilo (93:7; v/v/v) com gradiente variável (7% acetato de etilo até aos 20 min, 10% de acetato de etilo aos 30 min, com retoma ao valor inicial acetato de etilo (7%) até aos 45 minutos). Cada corrida teve a duração máxima de 45 minutos.

O fluxo usado foi de 0,5mL/min até aos 20 min e 1 mL/min a partir desse tempo, com um volume de injeção de 30µL. A detecção foi feita para todos os compostos a um comprimento de onda de 450nm, comprimento de onda no qual se identificam a maioria dos compostos esperados na observação. A fase móvel escolhida está também relacionada com a melhor separação dos compostos.

Para que fosse possível quantificar as amostras recolhidas ao longo do estudo, efectuaram-se curvas de calibração com os seguintes padrões: Astaxantina (SIGMA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO EUA) $\geq 92\%$ FW= 596,9; β -caroteno (SIGMA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO EUA) $\geq 95\%$ FW= 536,89; Luteína (Fluka, Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) $\sim 90\%$ FW= 568,90; Zeaxantina (Fluka, Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) $\geq 95\%$ FW= 568,87.

A quantificação dos compostos nas amostras foi efectuada com recurso a calibração externa.

3.4. Análise estatística

Após a obtenção de todos os resultados confirmou-se a normalidade dos valores pelo teste *Shapiro-Willks*. Os resultados obtidos relativamente ao estudo dos ácidos gordos entre intergrupos (comparação entre grupos diferentes) foram posteriormente tratados estatisticamente, recorrendo para isso à análise da regressão de variâncias ANOVA univariável. Para comparações entre intragrupos (comparação dentro do mesmo grupo ao longo do tempo), utilizou-se o teste “T” de-student. Consideraram-se diferenças significativas para valores de

$p < 0,05$. Para análise estatística e realização de gráficos utilizou-se o software Microsoft Excel 2007 (Microsoft, Inc., EUA).

Todos os resultados foram expressos através da média de cada grupo e do respectivo desvio padrão. Nos casos em que se verificaram valores considerados *outliers*, estes foram excluídos e não entraram na análise dos resultados.

4.2. Determinação dos ácidos gordos dos órgãos e tecidos analisados

Em seguida, encontram-se os resultados obtidos da análise da presença de ácidos gordos nos eritrócitos (RBC), fígado, rim, coração, gordura visceral e gordura subcutânea nos grupos controlo e suplementado ao longo das diferentes etapas do estudo (15 dias, 1 mês e 2 meses).

Os resultados obtidos encontram-se nas figuras 18 a 31, estando em anexo as respectivas tabelas dos resultados.

4.2.1. Composição percentual de ácidos gordos dos Eritrócitos

Nas figuras 18 e 19 encontram-se respectivamente representados os dados obtidos da composição percentual de ácidos gordos nos diferentes grupos e a variação da mesma no grupo suplementado.

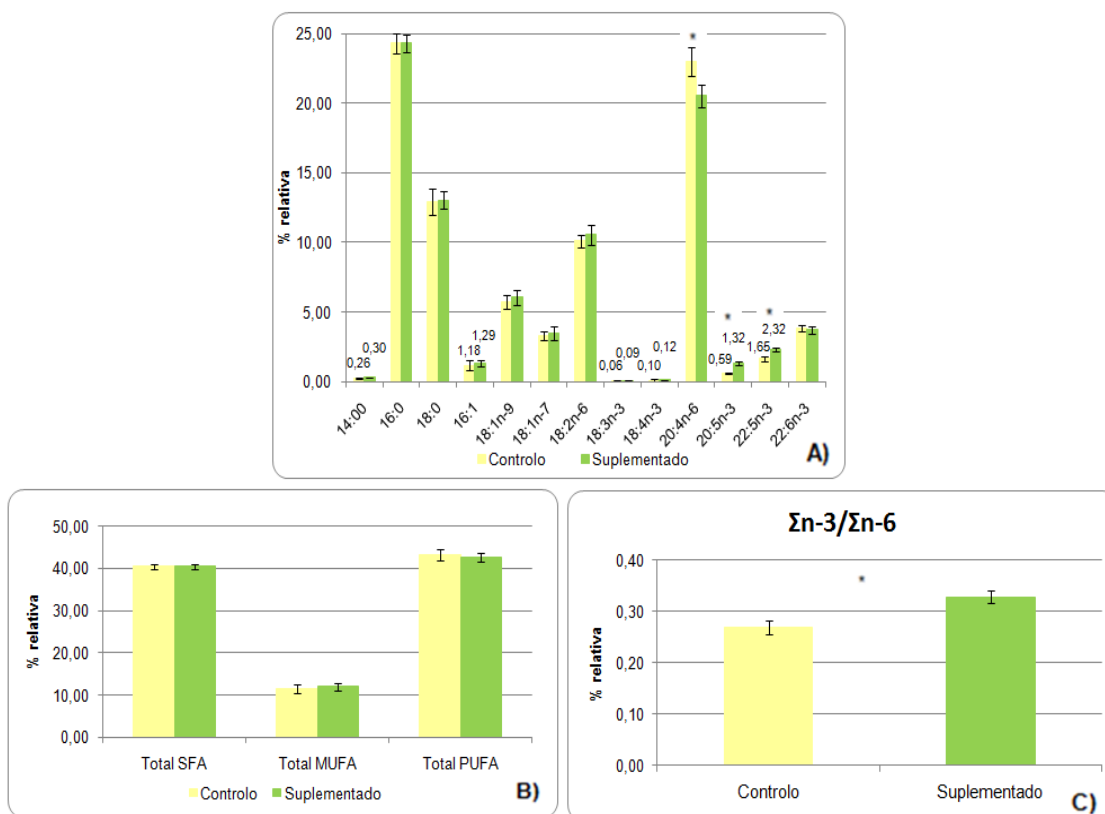


Figura 18- Composição percentual dos ácidos gordos dos eritrócitos ao fim de 2 meses no grupo controlo e grupo suplementado: **A)** Distribuição dos diferentes ácidos gordos; **B)** Distribuição de ácidos gordos totais em função do grau de saturação; **C)** Variação da razão de $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ nos diferentes grupos. (*- existência de diferenças significativas entre os grupos- p -value < 0,05).

Como se verifica na figura 18 A) ao fim de 2 meses observam-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para o ácido gordo AA, EPA e DPA. À excepção do

AA, quer o EPA, quer o DPA apresentam uma percentagem de incorporação superior nos eritrócitos do grupo de ratinhos suplementados (EPA: 1,32% ± 0,11 e DPA: 2,32% ± 0,10), em comparação ao grupo controlo (EPA: 0,59% ± 0,07 e DPA: 1,65% ± 0,16).

Também a análise da razão $\Sigma n-3 / \Sigma n-6$, regista diferenças significativas ($p < 0,05$), verificando-se uma superioridade percentual da mesma no grupo sujeito a suplementado com *D. vlkianum* (figura 18 C). Por sua vez, os resultados obtidos para o total de SFA, MUFA e PUFA não revelaram a existência de diferenças significativas (figura 18 B).

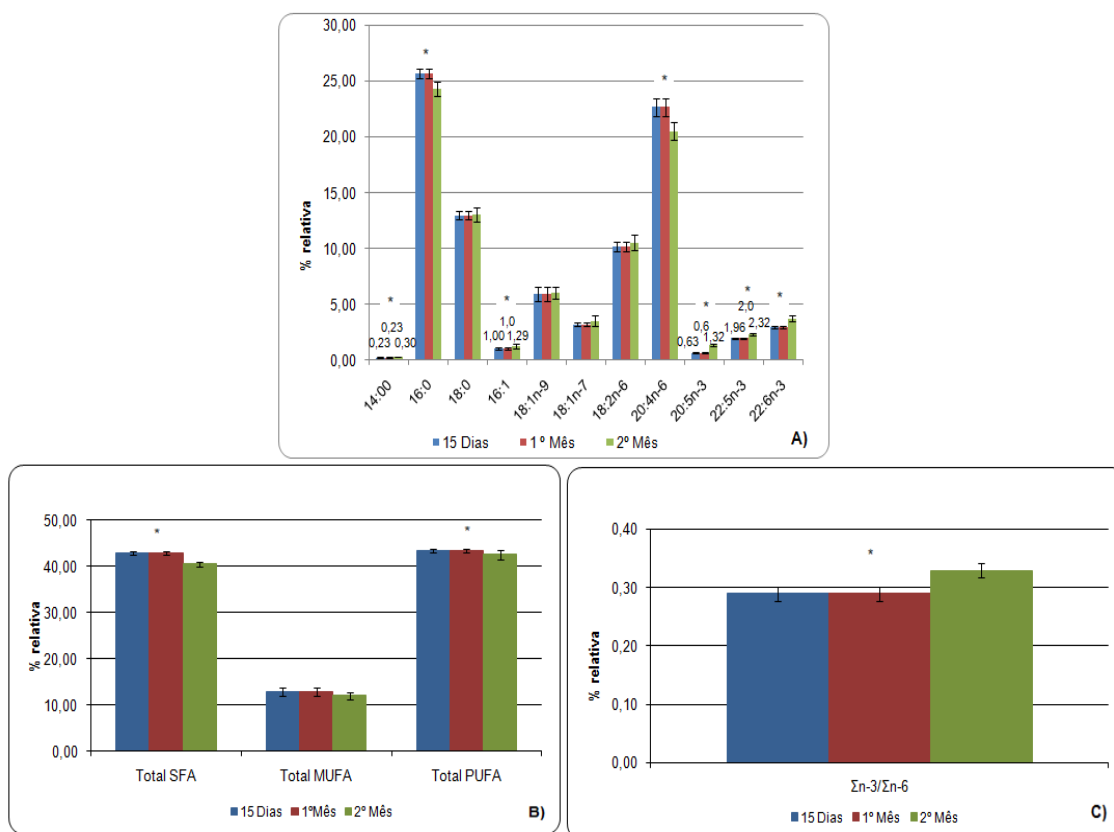


Figura 19- Variação percentual de ácidos gordos dos eritrócitos em diferentes etapas do estudo no grupo suplementado com *D. vlkianum*. **A)** Variação dos diferentes ácidos gordos ao longo do tempo; **B)** Variação dos ácidos gordos totais em função do grau de saturação ao longo do tempo; **C)** Variação da razão $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ ao longo do tempo (*- existência de diferenças significativas entre os grupos- p -value<0,05).

Pela análise da figura 19 observa-se que os biomarcadores de especial importância neste estudo (EPA, DPA, DHA e a razão $\Sigma n-3/\Sigma n-6$) revelam um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) ao fim de 2 meses de suplementação (figura 19 A,C).

O total de saturados apresenta igualmente diferenças significativas ($p < 0,05$) no final do estudo, registando-se uma diminuição da sua percentagem (figura 20 B).

4.2.2. Composição percentual de ácidos gordos do Fígado

A distribuição e variação percentual ao longo do estudo dos diferentes ácidos gordos em análise são visíveis nas figuras 20 e 21, respectivamente. Na tabela 2 presente nos anexos, encontram-se os restantes resultados obtidos.

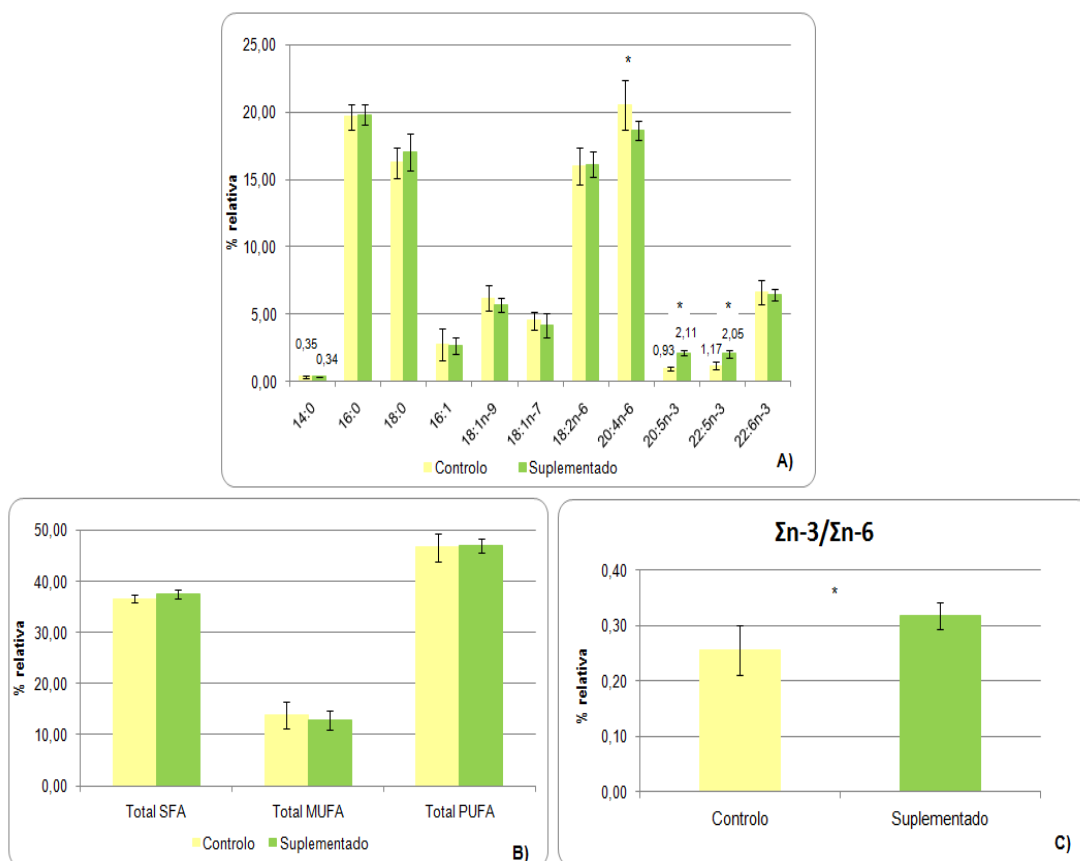


Figura 20- Composição percentual dos ácidos gordos do fígado ao fim de 2 meses no grupo controlo e grupo suplementado: **A)** Distribuição dos diferentes ácidos gordos; **B)** Distribuição de ácidos gordos totais em função do grau de saturação; **C)** Variação da razão de $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ nos diferentes grupos. (*- existência de diferenças significativas entre os grupos- $p\text{-value} < 0,05$).

A análise estatística efectuada entre grupos no final do estudo revela diferenças significativas ($p < 0,05$) para o AA, EPA, DPA, total de SFA e para a razão $\Sigma n-3/\Sigma n-6$. Do conjunto de compostos referidos anteriormente todos registam superioridade percentual no grupo suplementado, exceptuando o AA (figura 20 A e C).

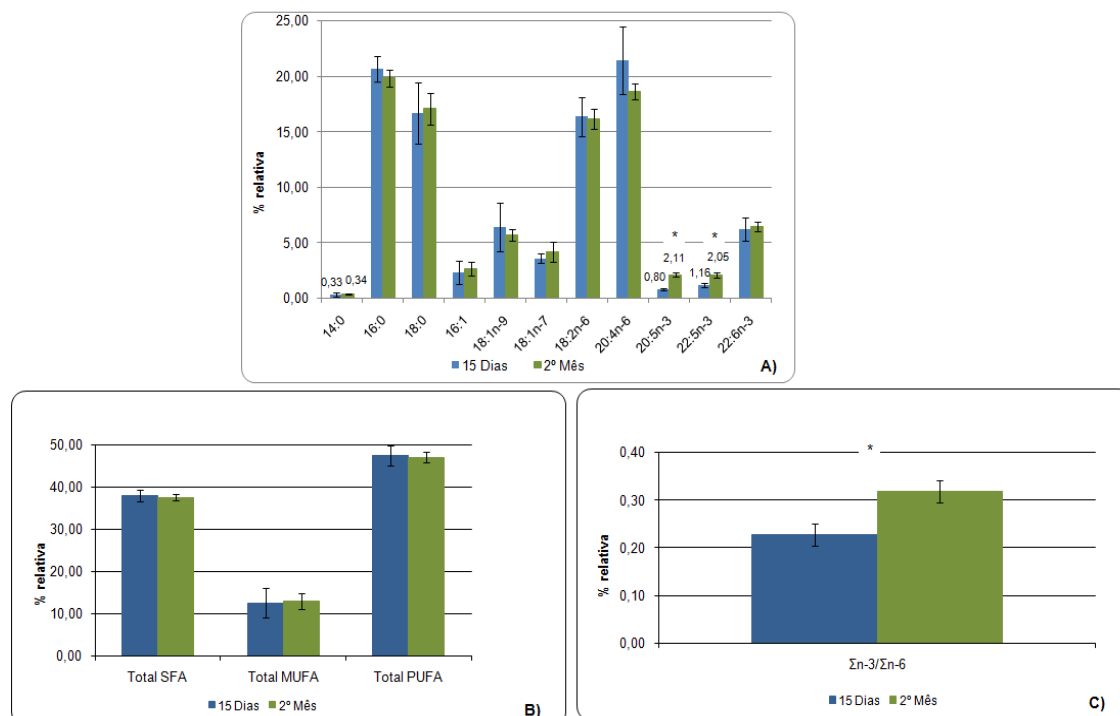


Figura 21- Variação percentual de ácidos gordos do fígado em diferentes etapas do estudo no grupo suplementado com *D.vlkianum*: **A)** Variação dos diferentes ácidos gordos ao longo do tempo; **B)** Variação dos ácidos gordos totais em função da saturação ao longo do tempo; **C)** Variação da razão $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ ao longo do tempo (*- existência de diferenças significativas entre os grupos-*p-value*<0,05).

Pela observação da figura 21 A), constata-se ainda uma variação com aumento estatisticamente significativo do EPA (início 0,80%±0,06 vs fim 2,11%±0,19), DPA (início 1,16%±0,19 vs fim 2,05%±0,25) e da razão $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ (início 1,23%±0,02 vs fim 0,32 %±0,02) entre o início e fim da suplementação.

Os resultados obtidos não determinaram a presença de outras diferenças estatísticas consideráveis.

4.2.3. Composição percentual de ácidos gordos do Coração

A composição em percentagem de ácidos gordos no coração dos diferentes grupos é apresentada na figura 22. Na figura 23 é visível a variação percentual registada para o coração ao longo da suplementação.

O resultado obtido para a distribuição e variação da composição percentual de ácidos gordos no coração ao longo do tempo e nos diferentes grupos encontra-se também disponível na tabela 3 dos anexos.

A análise estatística efectuada entre os dois grupos no final do estudo, apenas revela a existência de diferenças significativas (*p*<0,05) para o EPA (figura 22 A), sendo o nível de EPA superior no grupo sujeito a suplementação.

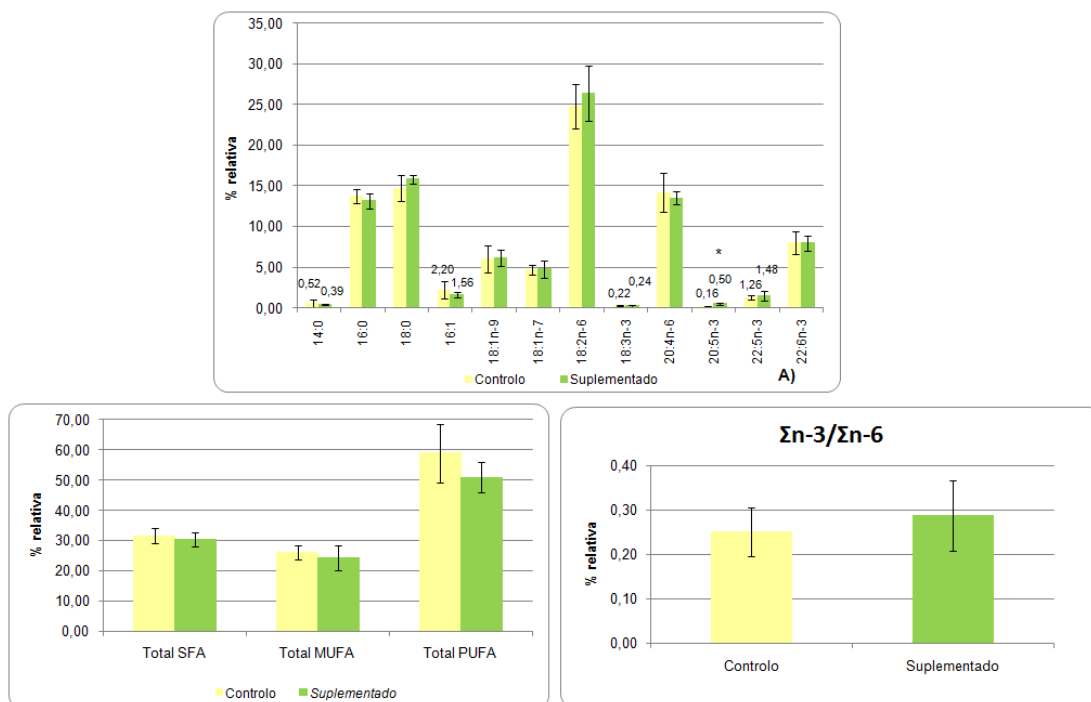


Figura 22 - Composição percentual dos ácidos gordos do coração ao fim de 2 meses no grupo controlo e grupo suplementado **A)** Distribuição dos diferentes ácidos gordos; **B)** Distribuição de ácidos gordos totais em função do grau de saturação; **C)** Variação da razão de Σn-3/Σn-6 nos diferentes grupos. (*- existência de diferenças significativas entre os grupos-*p-value*<0,05)

Relativamente à análise da variação da composição percentual de ácidos gordos ao longo do estudo no grupo suplementado, apuram-se diferenças significativas (*p*<0,05) com particular interesse para o ácido gordo AA e EPA.

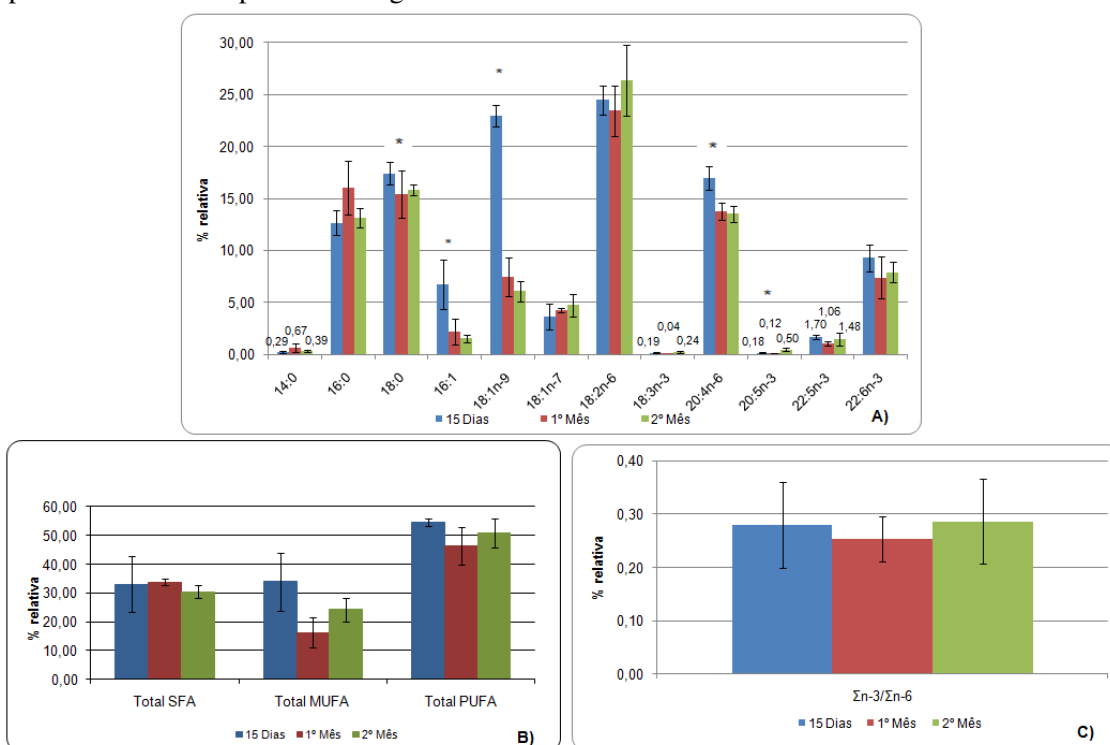


Figura 23-Variação percentual de ácidos gordos do coração em diferentes etapas do estudo no grupo suplementado com *D. vlkianum*: **A)** Variação dos diferentes ácidos gordos ao longo do tempo; **B)** Variação dos ácidos gordos totais em função do grau de saturação ao longo do tempo; **C)** Variação da razão Σn-3/Σn-6 ao longo do tempo (*- existência de diferenças significativas entre os grupos- *p-value*<0,05).

Ao passo que o AA apresenta uma diminuição significativa no seu valor ao fim de dois meses, para o EPA observa-se precisamente o contrário (figura 23 A).

4.2.4. Composição percentual de ácidos gordos do Rim

A distribuição e variação da composição percentual de ácidos gordos no rim encontra-se representada na figura 24 e 25, respectivamente.

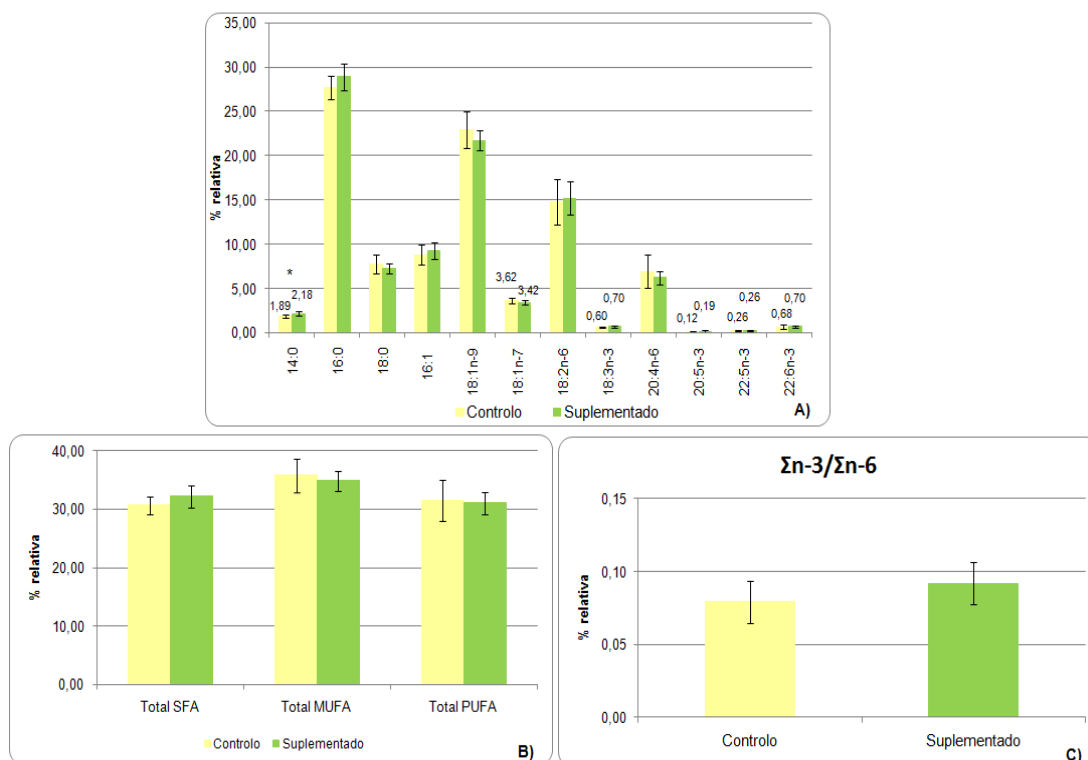
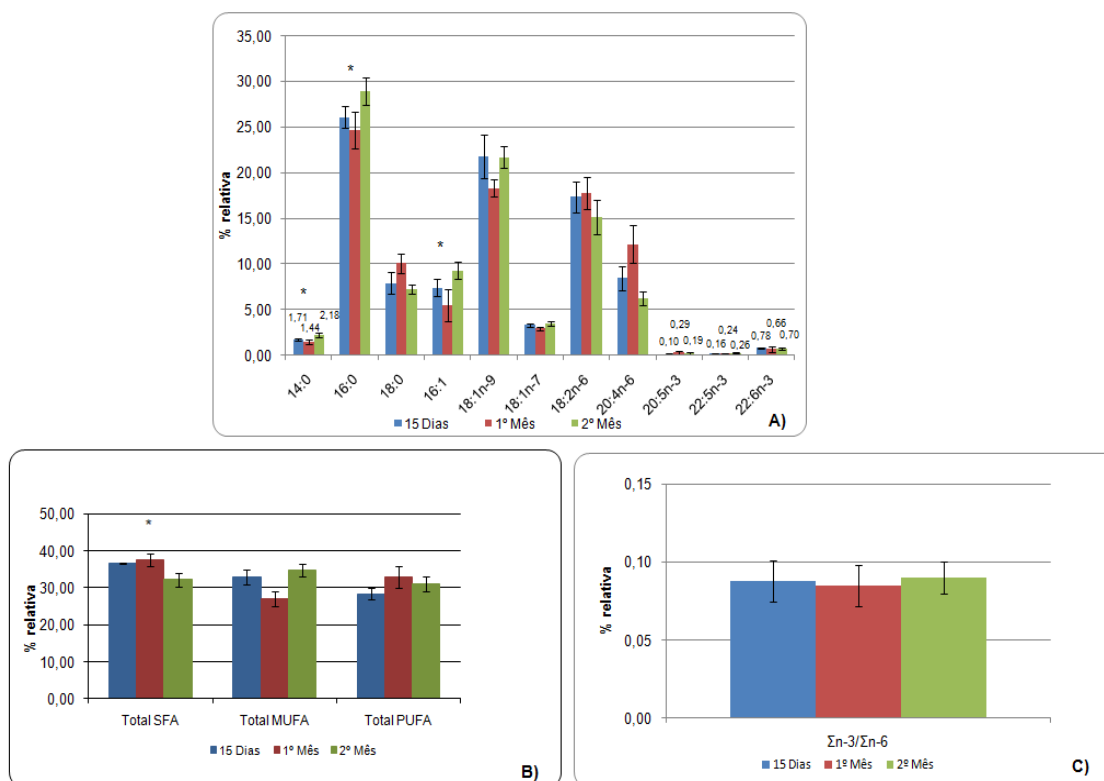


Figura 24- Composição percentual dos ácidos gordos do rim ao fim de 2 meses no grupo controlo e grupo suplementado: **A)** Distribuição dos diferentes ácidos gordos; **B)** Distribuição de ácidos gordos totais em função do grau de saturação; **C)** Variação da razão de Σn-3/Σn-6 nos diferentes grupos (*-existência de diferenças significativas entre os grupos-*p-value*<0,05).

A determinação da composição percentual de ácidos gordos ao fim de 2 meses nos diferentes grupos, não afere diferenças significativas (*p*<0,05) nos biomarcadores com maior interesse para este estudo (EPA; DPA e DHA).

Para o rim, o efeito da suplementação com *D. vlkianum* durante 2 meses apenas se traduz alterações percentuais significativas no ácido mirístico (figura 24 A).

A análise da variação percentual de ácidos gordos no grupo suplementado revela a existência de diferenças significativas (*p*<0,05) no ácido 14:0, 16:0, 16:1, sem registo de outras alterações significativas (figura 24 A).



Simultaneamente, a composição percentual do total de SFA no rim no final da suplementação revela uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (figura 25 B).

4.2.5. Composição percentual de ácidos gordos da Gordura Subcutânea

Os gráficos da figura 26 são relativos à composição percentual dos ácidos gordos na gordura subcutânea determinada para os diferentes grupos.

Os resultados obtidos reflectem a ocorrência de diferenças significativas ($p < 0,05$) para o EPA ($0,06\% \pm 0,05$ no grupo controlo vs $0,21\% \pm 0,04$ no grupo suplementado) e para a razão $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ (grupo controlo: $0,07\% \pm 0,01$ e grupo suplementado: $0,09\% \pm 0,01$). Quer num caso, quer noutro, as diferenças verificadas encontram-se associadas a um aumento da composição percentual na gordura subcutânea observada no grupo suplementado (figura 26 A).

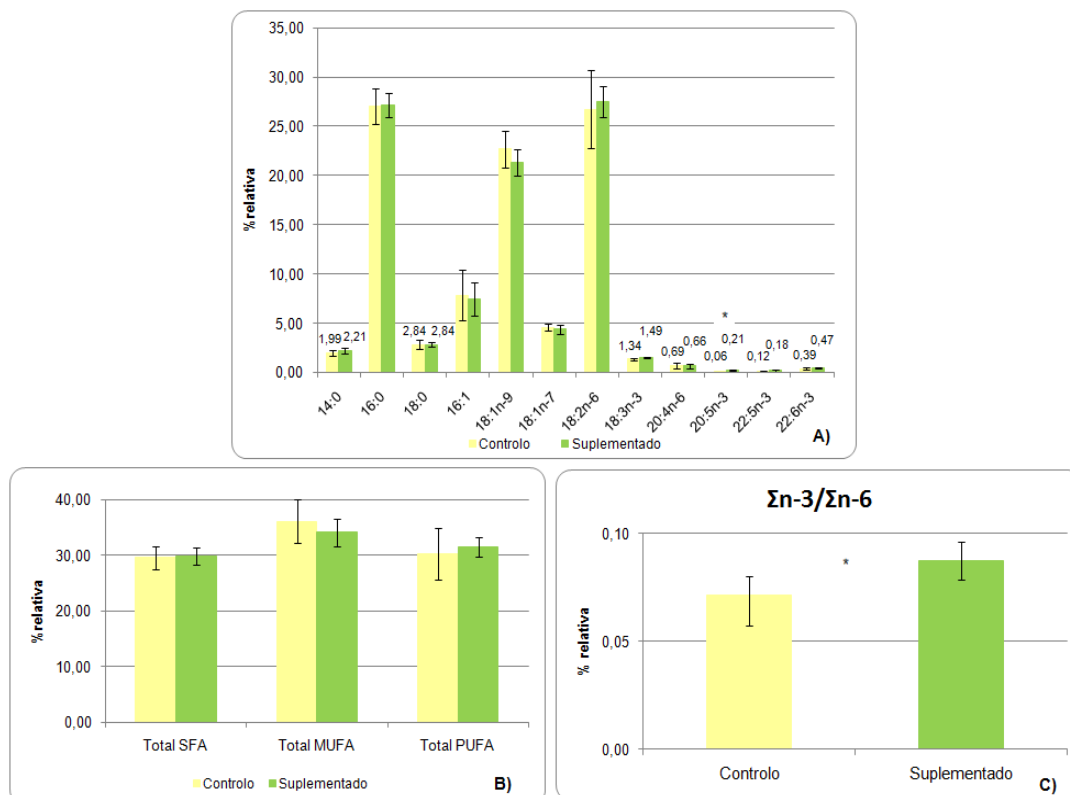


Figura 26- Composição percentual dos ácidos gordos da gordura subcutânea ao fim de 2 meses no grupo controlo e grupo suplementado: **A)** Distribuição dos diferentes ácidos gordos; **B)** Distribuição de ácidos gordos totais em função do grau de saturação; **C)** Variação da razão de $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ nos diferentes grupos (*- existência de diferenças significativas entre os grupos- p -value<0,05).

A figura 27 representa a variação da composição percentual no grupo de ratinhos suplementados ao longo do tempo.

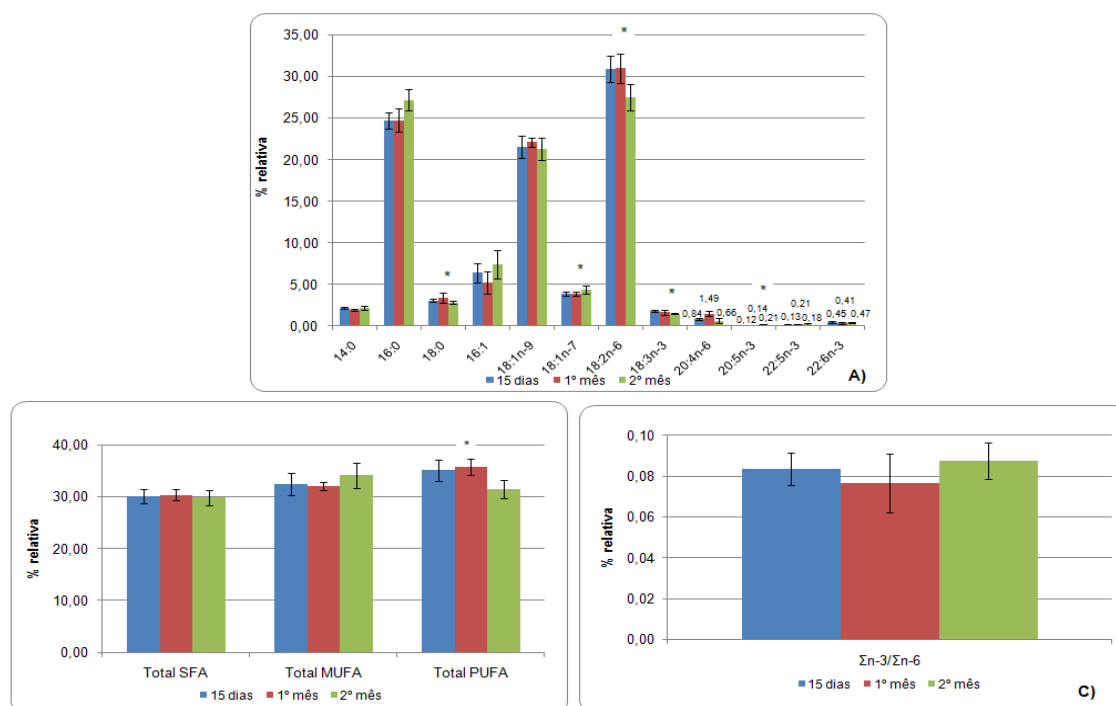


Figura 27- Variação percentual de ácidos gordos da gordura subcutânea em diferentes etapas do estudo no grupo suplementado com *D.vlkianum*: **A)** Variação dos diferentes ácidos gordos ao longo do tempo; **B)** Variação dos ácidos gordos totais em função do grau de saturação ao longo do tempo; **C)** Variação da razão $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ ao longo do tempo (*- existência de diferenças significativas entre os grupos- p -value<0,05).

A figura 27, mostra então que existem diferenças significativas ($p<0,05$) para o biomarcador da dieta EPA no final da suplementação. Assinala-se assim um aumento percentual no início do estudo de $0,06\% \pm 0,05$ para $0,24\% \pm 0,04$ (figura 27 A).

O mesmo tipo de análise aferiu diferenças significativas para o total de PUFA, apesar desta diferença ser causada pela diminuição percentual do total PUFA no final do estudo (início $35,11\% \pm 2,02$ vs fim $31,41\% \pm 1,72$) (figura 27 B).

4. 2.6. Composição percentual de ácidos gordos da Gordura Visceral

As figuras 28 e 29 são relativas à composição percentual de ácidos gordos na gordura visceral determinada nos dois grupos e na sua variação no grupo sujeito a suplementação.

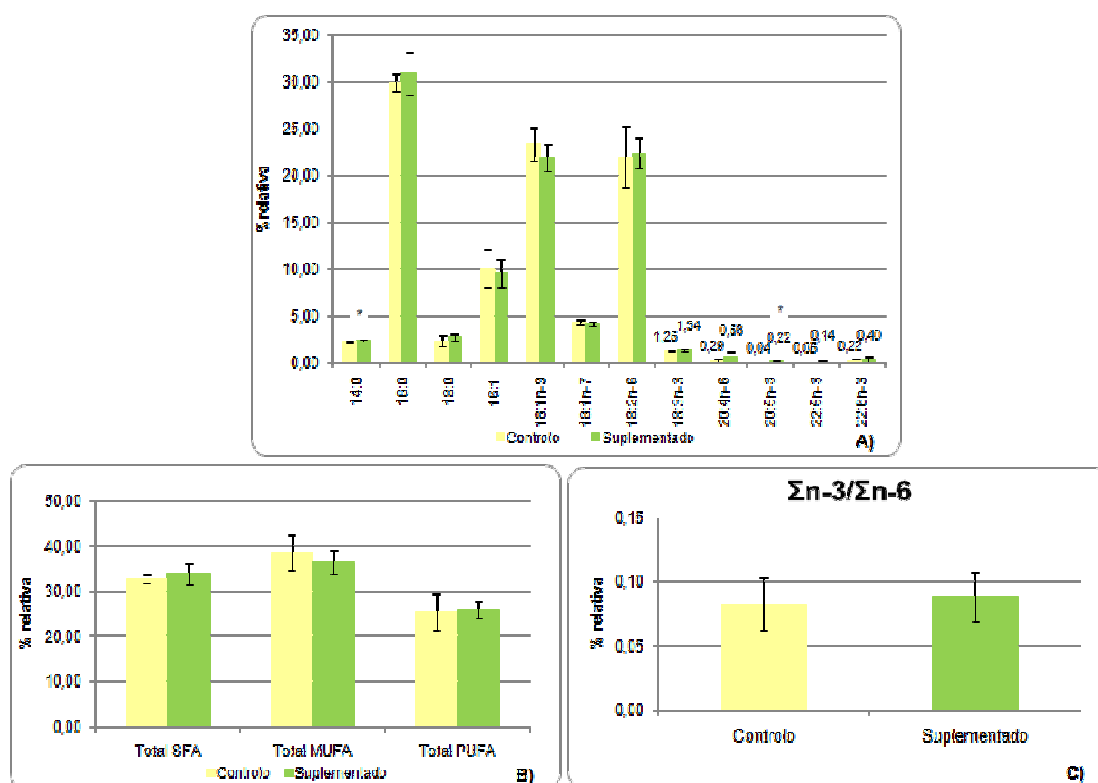


Figura 28- Composição percentual dos ácidos gordos da gordura visceral ao fim de 2 meses no grupo controlo e grupo suplementado: **A)** Distribuição dos diferentes ácidos gordos; **B)** Distribuição de ácidos gordos totais em função do grau de saturação; **C)** Variação da razão de $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ nos diferentes grupos (*- existência de diferenças significativas entre os grupos- p -value<0,05).

Relativamente aos resultados da distribuição percentual dos ácidos gordos na gordura visceral nos diferentes grupos, verificam-se diferenças significativas ($p<0,05$) para o EPA (figura 28 A). A percentagem registada de EPA, revelou ser significativamente superior no grupo suplementado ($0,22\% \pm 0,07$) em comparação com o grupo controlo ($0,04\% \pm 0,03$).

Para o total de SFA, MUFA, PUFA e razão $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ não foram determinadas diferenças significativas.

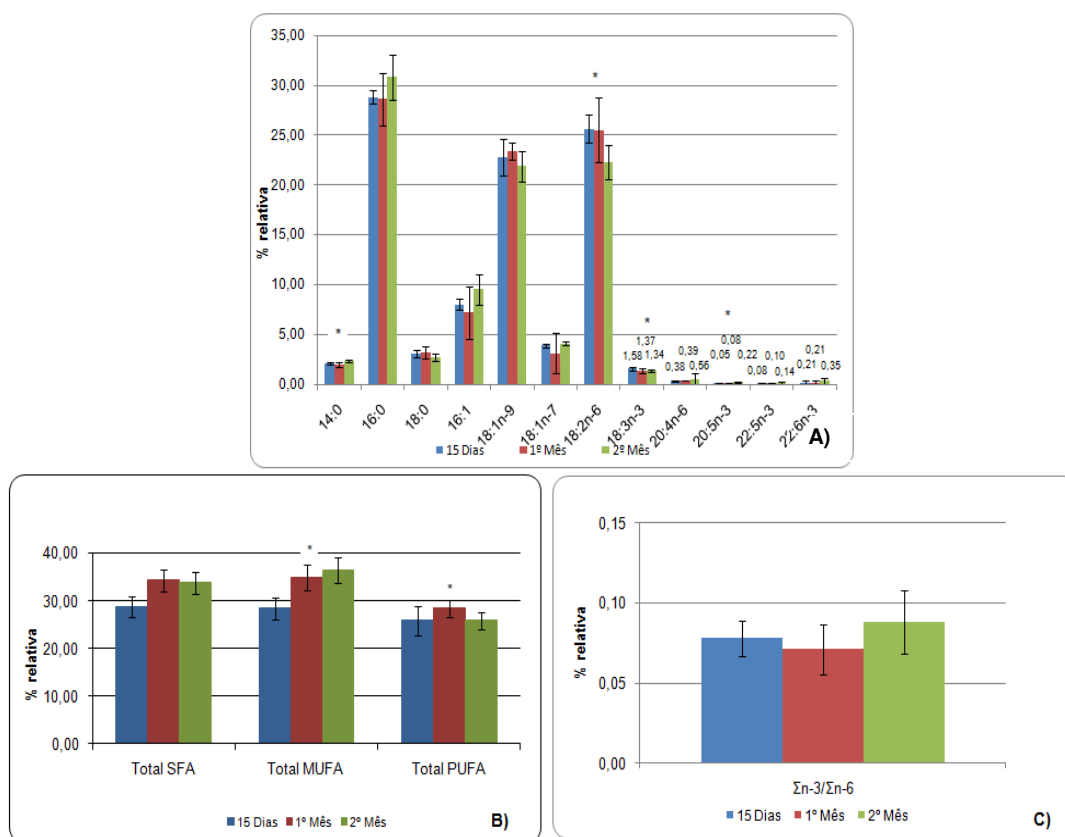


Figura 29- Variação percentual de ácidos gordos da gordura visceral em diferentes etapas do estudo no grupo suplementado com *D. vlkianum*: **A)** Variação dos diferentes ácidos gordos ao longo do tempo; **B)** Variação dos ácidos gordos totais em função do grau de saturação ao longo do tempo; **C)** Variação da razão $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ ao longo do tempo (*- existência de diferenças significativas entre os grupos-*p-value*<0,05).

A variação da composição percentual de ácidos gordos na gordura visceral no grupo suplementado revela diferenças significativas ($p < 0,05$) para o EPA, total de MUFA e PUFA. O valor percentual observado de EPA e total de MUFA é visivelmente superior no final dos 2 meses de suplementação.

4.2.7. Comparação dos níveis de EPA, DPA e DHA nos diferentes órgãos e tecidos

A figura 30 reporta para a incorporação em níveis percentuais dos biomarcadores mais importantes neste estudo (EPA, DPA, DHA).

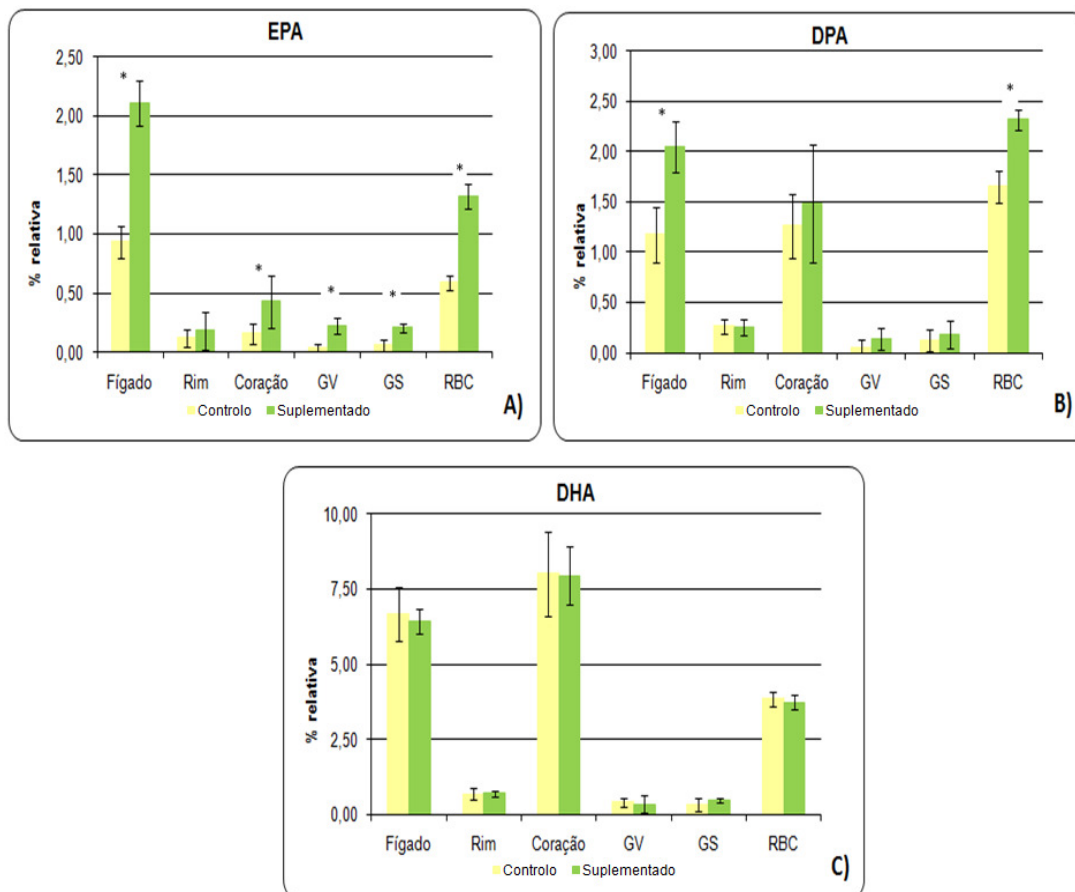


Figura 30- Comparação entre a percentagem relativa de EPA A), DPA B) e C) DHA nos diferentes órgãos e tecidos analisados (GV- Gordura Visceral; GS- Gordura Subcutânea, RBC- eritrócitos; * - existência de diferenças significativas ($p < 0,05$)).

Pela figura 30 constata-se que o EPA e DPA são maioritariamente incorporados no fígado e nos eritrócitos dos ratinhos suplementados, observando-se diferenças significativas entre o grupo controlo e grupo suplementado. A deposição de DHA é visivelmente maioritária no coração, mas de modo semelhante em ambos os grupos.

Em contraste, a gordura subcutânea e visceral são os locais onde se regista menor composição percentual dos biomarcadores considerados.

A análise permite também observar que no caso do EPA e DPA a sua percentagem relativa é consideravelmente superior para os ratinhos sujeitos a suplementação nos vários órgãos analisados, o que não se verifica na incorporação de DHA.

4.2.8. Composição percentual de ácidos gordos da Análise Fecal

Procedeu-se ainda à determinação do perfil de ácidos gordos em amostras de fezes recolhidas ao longo do estudo nos diferentes grupos, de modo a obter uma amostragem considerável de análise que representasse a variação da excreção de ácidos gordos ao longo do tempo. Esta amostragem foi feita com base numa selecção de diversos dias com o intuito de cobrir a duração total do estudo: fase inicial (1°,2°,3°,6°,8°), fase intermédia (18°,28°,38°) e fase final (48°,58°,66°). Como se pode observar pela figura 31 A) e C), os níveis em percentagem do total de SFA, MUFA e PUFA não variam de modo constante ao longo do estudo, podendo-se ainda inferir que o total de MUFA é o que se encontra em menor percentagem ao longo dos dias na colheita fecal.

Nos dois grupos, como revela a figura 31 B) e D), o somatório de n-3 é consideravelmente excretado em menores quantidades quando comparado com a excreção diária do somatório de n-6.

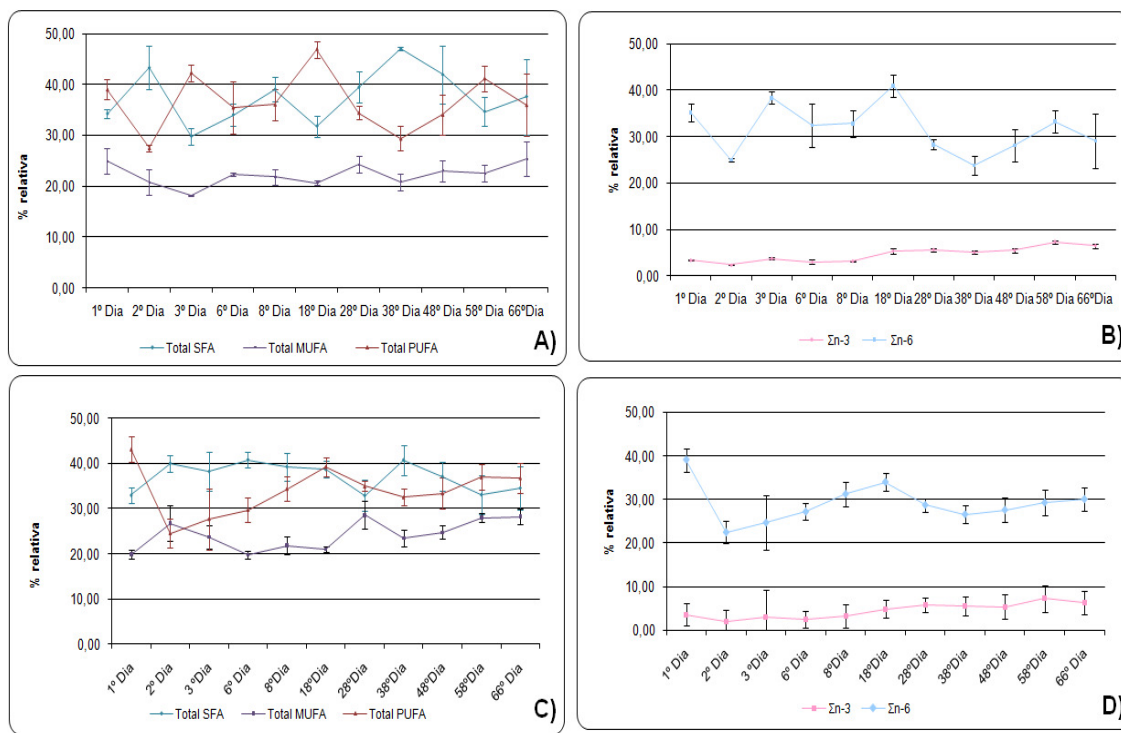


Figura 31- A) Variação percentual de ácidos gordos totais na análise fecal ao longo do tempo no grupo controlo; B) Variação de Σ n-3 e Σ n-6 ao longo do tempo no grupo controlo; C) Variação percentual de ácidos gordos totais em função da sua saturação na análise fecal ao longo do tempo no grupo suplementado; D) Variação percentual de Σ n-3 e Σ n-6 ao longo do tempo no grupo suplementado.

A análise estatística revelou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o primeiro e último dia de recolha fecal quer no grupo controlo, quer no grupo suplementado para o total de SFA, MUFA, PUFA, Σ n-3 e Σ n-6. Foram ainda determinadas diferenças estatísticas quando na comparação entre o grupo controlo e suplementado.

4.3. Optimização da metodologia (HPLC)

4.3.1 Limites de Detecção e Quantificação dos diferentes padrões

A calibração dos padrões utilizados (luteína, zeaxantina, astaxantina e β -caroteno) foi feita com 5 níveis de diferentes concentrações efectuadas com duplicados ($n=10$ determinações),   excepção do padrão do β -caroteno, para os quais se usaram 4 níveis ($n=8$ determinações). Cada nível de calibração corresponde a uma concentração particular do respectivo componente, no caso do padrão de luteína as concentrações variaram entre 0,20 $\mu\text{g/mL}$ a 1,00 $\mu\text{g/mL}$ (0,20 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 0,33 $\mu\text{g/mL}$, 0,50 $\mu\text{g/mL}$ e 1,00 $\mu\text{g/mL}$) na zeaxantina entre 0,10 $\mu\text{g/mL}$ a 0,80 $\mu\text{g/mL}$, (0,13 $\mu\text{g/mL}$, 0,20 $\mu\text{g/mL}$, 0,30 $\mu\text{g/mL}$, 0,40 $\mu\text{g/mL}$ e 0,80 $\mu\text{g/mL}$) para a astaxantina as curvas de calibração foram efectuadas com concentrações entre 3,00 $\mu\text{g/mL}$ a 60,00 $\mu\text{g/mL}$ (3,00 $\mu\text{g/mL}$, 6,00 $\mu\text{g/mL}$, 15,00 $\mu\text{g/mL}$, 30,00 $\mu\text{g/mL}$ e 60,00 $\mu\text{g/mL}$) e para o β -caroteno utilizaram-se 4 níveis com concentrações variáveis entre os 25,00 $\mu\text{g/mL}$ e 200,00 $\mu\text{g/mL}$ (25,00 $\mu\text{g/mL}$, 50,00 $\mu\text{g/mL}$, 100,00 $\mu\text{g/mL}$ e 200,00 $\mu\text{g/mL}$). Para construção de curvas de calibração foi adicionado o ponto (0,0), a fim de garantir uma melhor linearidade dos valores.

A repetibilidade para o método foi determinada com o recurso a múltiplas análises para amostras idênticas obtidas a partir das mesmas condições efectuadas no mesmo dia e com a mesma gama de concentrações.

A linearidade obtida foi determinada com base nas diferentes concentrações dos padrões referidas anteriormente, efectuadas em duplicado. Tendo sido aplicadas as mesmas condições em todas as amostras. A linearidade do método foi então confirmada por regressão estatística (coeficiente de correla o- r).

Na tabela 2, encontram-se os parâmetros de limites de quantificação e detecção, linearidade e repetibilidade para os diferentes padrões analisados de carotenóides.

	Curva de regressão	$a \pm S_a$ ($\mu\text{g/mL}$)	$b \pm S_b$ ($\mu\text{g/mL}$)	R^2	Linearidade (R)	Repetibilidade	LD ($\mu\text{g/mL}$) LQ ($\mu\text{g/mL}$)	
							$3x(S_{y/x}/b)$	$10x(S_{y/x}/b)$
[Luteinal] ($\mu\text{g/mL}$)	$y = 1171,2x - 95,68$	$-95,68 \pm 59,15$	$1171,16 \pm 119,85$	0,960	0,980	0,35	0,212	0,707
[Zeaxantina] ($\mu\text{g/mL}$)	$y = 389,96x - 20,225$	$389,96 \pm 35,10$	$-20,23 \pm 13,95$	0,968	0,984	1,10	0,151	0,503
[Astaxantina] ($\mu\text{g/mL}$)	$y = 19,519x + 120,9$	$19,52 \pm 4,63$	$120,90 \pm 335,68$	0,971	0,986	6,17	11,762	39,207
[β -caroteno] ($\mu\text{g/mL}$)	$y = 3,5959x + 37,809$	$3,60 \pm 1,09$	$37,81 \pm 112,05$	0,973	0,987	3,38	39,348	131,160

Tabela 2- Diferentes parâmetros metodológicos analisados para os diferentes carotenóides. a - ordenada na origem; b -declive; r -produto de correla o; t -parâmetros estatísticos; S_a - desvio padrão da ordenada na origem; S_b - desvio padrão do declive; LD- limite de detecção; LQ- limite de quantificação.

Como se verifica na tabela, a metodologia adoptada é mais sensível na quantificação (LQ ($\mu\text{g/mL}$)) e detecção (LD ($\mu\text{g/mL}$)) da zeaxantina.

A tabela informa ainda que a curva de calibração com melhor linearidade e regressão é a curva de calibração obtida para o padrão β -caroteno ($r=0,987$). Em oposição, a curva de calibração de luteína é a que regista menor linearidade ($r=0,960$).

4.3.2. Tempos de retenção dos diferentes padrões

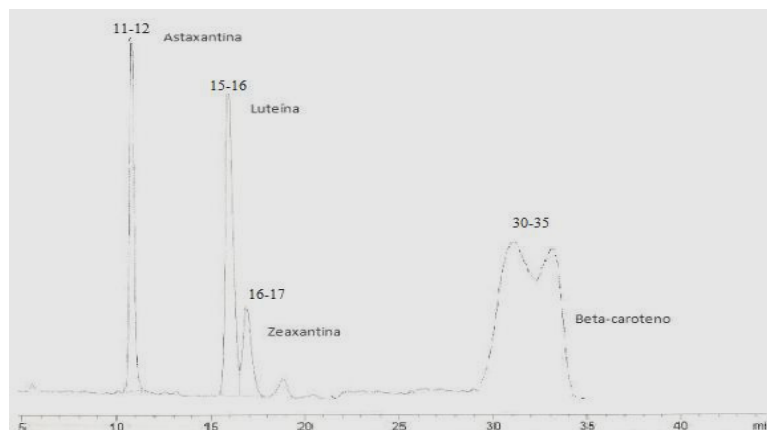


Figura 32- Representação do cromatograma dos padrões e respectivos tempos de retenção (astaxantina $rt \approx 11-12$ min; luteína $rt \approx 15-16$ min, zeaxantina $rt \approx 16-17$ min e β -caroteno $rt \approx 30-35$ min).

Como se pode verificar no cromatograma da figura 32, os tempos de retenção obtidos para os diferentes carotenóides analisados foram de 11 minutos aproximadamente para a astaxantina, 16 minutos para a luteína, 17 minutos para a zeaxantina e 30 minutos para o β -caroteno.

4.3.3. Perfil de carotenóides da *Chlorella vulgaris* e da ração

O valor de carotenóides totais determinados para a *Chlorella vulgaris* foi de 1,24 mg/g (peso seco). O perfil de carotenóides determinado com recurso da HPLC encontra-se no cromatograma representado na figura 33.

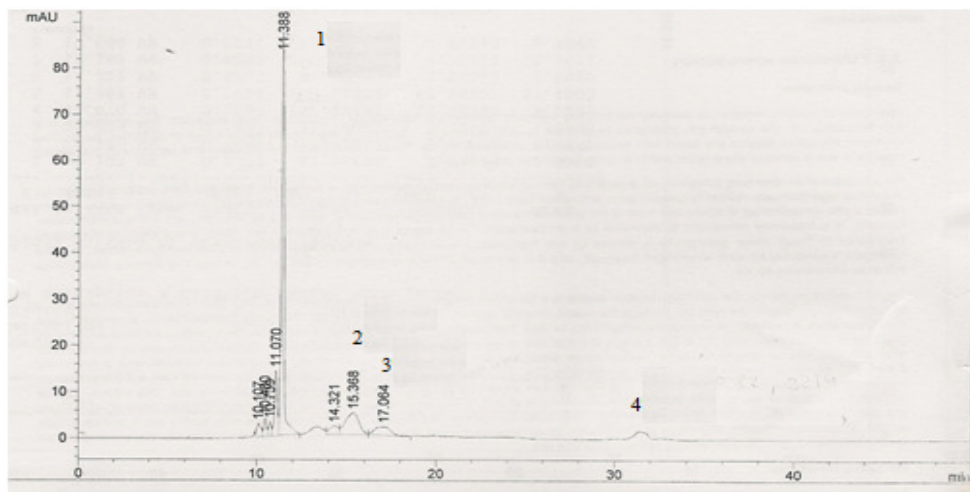


Figura 33- Cromatograma obtido para a *Chlorella vulgaris* (1: Astaxantina; 2: Luteína; 3: Zeaxantina; 4: β caroteno).

Pelo cromatograma constata-se que a microalga *Chlorella vulgaris* apresenta na sua constituição os seguintes carotenóides: astaxantina (rt=11,388 min), luteína (rt=15,368 min), zeaxantina (rt=17,064 min) e β -caroteno (rt=32 min). A quantificação destes compostos, permitiu averiguar que a *Chlorella vulgaris* apresenta maior nível em astaxantina (54,72%±3,02), seguido de luteína (14,43%±1,12), zeaxantina (6,46%±1,11) e por último β -caroteno (4,80%±1,03).

A tabela seguinte evidencia a composição percentual dos carotenóides na *Chlorella vulgaris* e na ração.

	<i>C.vulgaris</i> (Média%±D.P.)	Ração (Média%±D.P.)
Astaxantina	54,72±3,02	N.D.
Luteína	14,43±1,12	N.D.
Zeaxantina	6,46±1,11	N.D.
β-caroteno	4,8± 1,03	N.D.

Tabela 3- Perfil percentual dos carotenóides na microalga *C. vulgaris* e na ração.

Como se observa pela tabela 3, não houve registo da presença de carotenóides na ração.

4.3.4. Análise da presença de carotenóides nos órgãos e tecidos recolhidos

A figura 34 refere-se a um exemplo de cromatograma obtido para o fígado nos dois grupos.

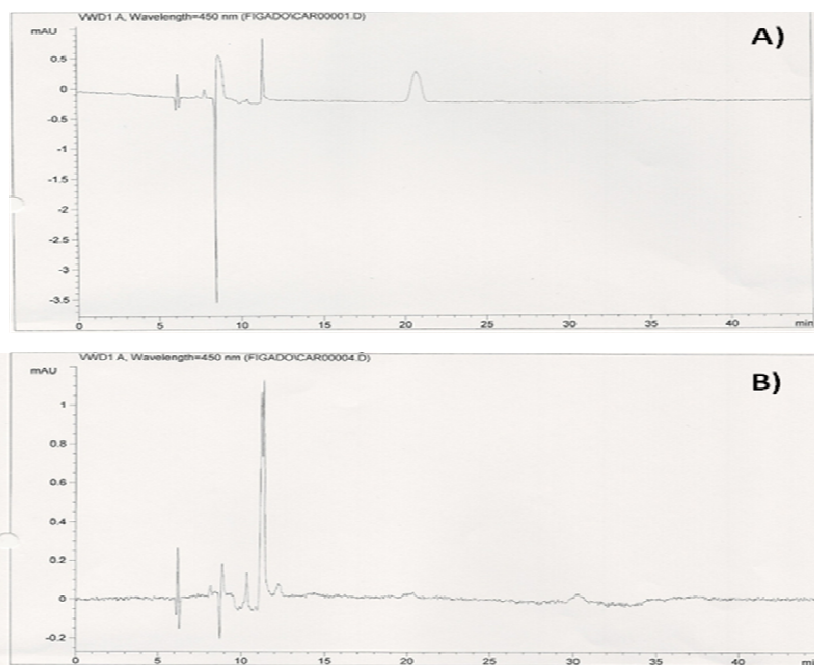


Figura 34- Cromatograma exemplo da análise de carotenóides do fígado no grupo controlo (A) e suplementado (B)

Como se pode verificar pela figura anteriormente representada, quer no grupo controlo quer no grupo suplementado não se verifica a presença de carotenóides no fígado. Esta observação foi semelhante para os demais órgãos analisados.

4.3.5. Análise da presença de carotenóides nas amostras fecais

Para o grupo suplementado ao longo do estudo analisaram-se aleatoriamente um conjunto de amostras de fezes de 5 ratinhos diferentes com o intuito de cobrir uma gama de dias iniciais, intermédios e finais do estudo.

Os resultados obtidos para a eliminação diária de carotenóides ao longo da suplementação encontram-se na figura 35.

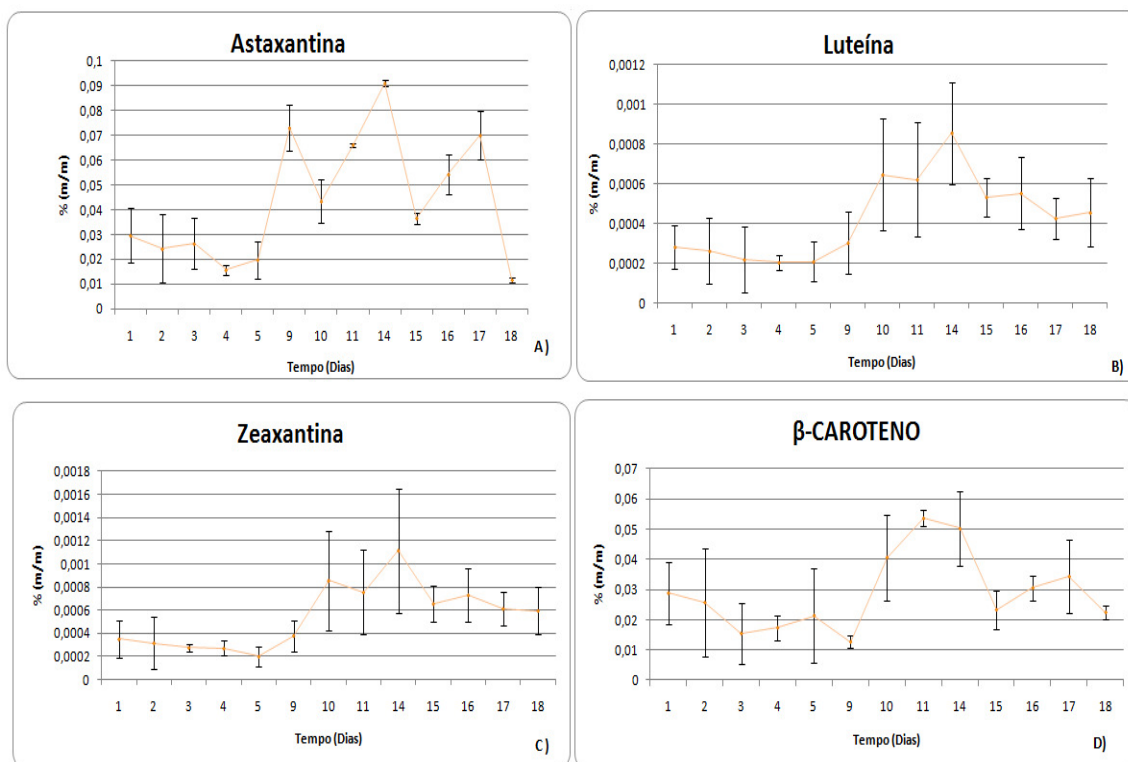


Figura 35 – A) Eliminação da astaxantina (%m/m) ao longo do tempo em ratinhos suplementados; **B)** Eliminação da luteína (%m/m) ao longo do tempo em ratinhos suplementados; **C)** Eliminação da zeaxantina (%m/m) ao longo do tempo em ratinhos suplementados; **D)** Eliminação do β -caroteno (%m/m) ao longo do tempo em ratinhos suplementados.

A média de excreção em percentagem massa/massa para os diferentes carotenóides foi de $0,043\% \pm 0,0045$ ($110,48\mu\text{g}/\text{mL} \pm 45,79$) para a astaxantina, $0,00043\% \pm 0,00020$ ($1,17\mu\text{g}/\text{mL} \pm 0,60$) para a luteína, $0,00055\% \pm 0,00027$ ($1,49\mu\text{g}/\text{mL} \pm 0,79$) para a zeaxantina e $0,0289\% \pm 0,012$ ($82,69\mu\text{g}/\text{mL} \pm 27,30$) para o β -caroteno.

A análise estatística efectuada revelou a presença de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o primeiro e o último dia de excreção. Resultado comum aos diferentes pigmentos.

No entanto, a variação (início vs fim) da eliminação dos 4 pigmentos não revelou ser estatisticamente significativa.

5. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

5.1. Análise de ácidos gordos na microalga *Diacronema vlkianum* e na ração

A dose diária administrada de *Diacronema vlkianum* não revelou efeitos de toxicidade ou intolerância, uma vez que não houve registo de mortes, perda de peso, ou alterações clínicas observáveis no grupo sujeito a suplementação (dados não apresentados). Foi ainda possível constatar que durante o estudo todos os ratinhos sofreram aumento de peso, pesando no final aproximadamente $300 \pm 15,9\text{g}$.

Uma vez que, o perfil lipídico determinado para a *D. vlkianum* apresenta valores consideravelmente superiores de AA, EPA, DPA e DHA em relação à ração, este conjunto de ácidos gordos será utilizado como biomarcador da dieta. De referir ainda que a matriz de *D. vlkianum* apresenta maior percentagem de EPA, verificando-se um valor percentual menor para o DHA.

Apesar da grande variabilidade de ácidos gordos registados nas microalgas, os valores obtidos para o perfil lipídico da *D. vlkianum* são idênticos aos determinados por Volkman *et al.* (1997).

5.2. Determinação dos ácidos gordos nos órgãos e tecidos analisados

5.2.1 Composição percentual de ácidos gordos dos Eritrócitos

A escolha dos eritrócitos como biomarcadores na incorporação de PUFA n-3 na dieta, deve-se essencialmente ao seu papel biológico, à facilidade de obtenção (método de recolha não invasivo), tratamento e estabilidade quando congelados a -80°C . (Harris e Shacky 2004; Hodson *et al* 2002). O tempo de vida (120 dias), dos eritrócitos, possibilita estabelecer uma correlação entre os níveis de ácidos gordos incorporados na dieta do mês anterior e a sua respectiva variação em células e tecidos (Harris e Shacky, 2004).

No presente estudo verificou-se a suplementação tinha efeitos na alteração da percentagem de EPA e DPA ao fim de dois meses, resultado expectável com o já obtido por outros autores. Em 1996, Prisco *et al.* verificaram que a suplementação com 3,4g/dia de EPA+ DHA durante 2 meses era suficiente para que se registasse um aumento da sua concentração nos fosfolípidos da membrana dos eritrócitos. Um estudo realizado por Cao *et al.* (2006) com a duração de 8 semanas, também observou um aumento dos níveis de EPA+ DPA+ DHA nas membranas dos eritrócitos de 6,11% para 10,24%, após suplementação diária com 1,3g EPA + 0,9g DHA. O mesmo autor mostrou ainda que durante duas semanas os níveis daqueles ácidos gordos se mantinham nas membranas dos eritrócitos, sendo possível correlacionar os seus valores com os valores da sua presença no plasma (Cao *et al.*, 2006).

Uma vez que a percentagem de DHA na microalga ($2,94\% \pm 0,55$) era consideravelmente superior à da ração ($0,52\% \pm 0,33$), seria de esperar o registo de diferenças significativas entre os dois grupos analisados, porém tal não se observou. Em 1997, Katan e mais recentemente Cao *et al.* (2006), mostraram que o DHA apresenta maior resistência às alterações da dieta em comparação com os níveis de EPA, o que se pode apresentar como justificação para o resultado obtido. Ainda como refere Arterburn *et al.* (2006), a suplementação com EPA traduz-se num aumento respectivo da concentração no plasma e nos fosfolípidos do soro, mas não no aumento da concentração de DHA. (Arterburn *et al.*, 2006).

É ainda possível relacionar os resultados obtidos do efeito da suplementação em *Diacronema vlkianum* na dieta e a prevenção de CHD. Segundo o índice de ómega-3 proposto por Harris e von Shacky (2004), é possível estabelecer uma relação entre os níveis de EPA e DHA nos eritrócitos do plasma e o risco de doenças cardiovasculares. Harris e Shacky, 2004). Assim, o valor encontrado no presente estudo para a soma de EPA e DHA, revelou ser superior em ratinhos suplementados (5,05%), em comparação com o grupo controlo (4,43%). Pode-se então inferir, que de acordo com este índice, a suplementação com *D. vlkianum* durante 2 meses encontra-se associada a uma zona de risco intermédio para o desenvolvimento de CHD. Como tal, uma suplementação diária com *D. vlkianum* seria benéfica para a diminuição do desenvolvimento de CHD.

A incorporação de *D. vlkianum* na dieta traduziu-se simultaneamente numa diminuição significativa da incorporação de AA. Apesar de seu papel na integridade das membranas celulares e mitocondriais, o AA é também um precursor da síntese eicosanóide e como tal de prostaglandinas e de tromboxanos (séries 2). (Dyerberg *et al.*, 1978) Como os tromboxanos são substâncias vasoconstritoras e estimuladoras da agregação plaquetária, funcionam como agentes hipertensivos, pelo que elevados níveis de tromboxanos em circulação no plasma podem conduzir ao desenvolvimento da formação de trombos nas artérias (Dyerberg *et al.*, 1978; Schmitz *et al.*, 2008). Deste modo, o registo observado na diminuição da composição percentual de AA nos eritrócitos é vantajoso para a saúde, pelo que se pode relacionar mais uma vez um consumo *D. vlkianum* como protector no desenvolvimento de trombozes e outras doenças coronárias (Dyerberg *et al.*, 1978; Schmitz *et al.*, 2008).

A suplementação contínua de *D. vlkianum* revelou ainda ser vantajosa no aumento da incorporação de EPA, DPA, DHA e $\Sigma n-3/\Sigma n-6$, o que se traduziria certamente em vantagens para o consumo humano.

O aumento da razão $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ em circulação revela, de acordo com o verificado por outros autores, a prevenção do risco de doenças cardiovasculares, devido à diminuição de ácidos gordos n-6 e aumento dos ácidos gordos n-3 em circulação (Dyerberg *et al.*, 1978; Schmitz *et al.*, 2008)

5.2.2. Composição percentual de ácidos gordos do Fígado

O fígado tem especial importância na síntese de ácidos gordos e como órgão de reserva lipídica. A análise do perfil lipídico neste órgão é determinante para a melhor avaliação da biodisponibilidade/bioincorporação dos ácidos gordos da dieta (Lien, 2009).

Os resultados obtidos para este órgão sugerem que o consumo de microalga durante 2 meses afecta a composição lipídica do fígado. Assim, os biomarcadores EPA e DPA registam um aumento significativo no grupo suplementado, assim como a razão $\Sigma n-3/\Sigma n-6$, o que suporta a introdução da microalga *Diacronema vlkianum* como fonte de ómega-3.

Seria ainda de esperar o registo de diferenças significativas para o DHA no grupo suplementado, visto existir uma afinidade especial para o mesmo em órgãos como o fígado, o que suporta o papel preponderante do DHA no metabolismo oxidativo dos ácidos gordos. (Raes *et al.*, 2004) Contudo, de acordo com Sardie *et al.* (1996) o DHA é sobretudo incorporado nos fosfolípidos das membranas, pelo que a análise deste órgão não o avalia

Como verificado para os eritrócitos, também no fígado se observa um efeito da suplementação na diminuição significativa de AA, o que como descrito anteriormente é benéfico em termos de saúde.

O facto de não se verificarem aumentos significativos na incorporação de DHA no grupo controlo ao fim de 2 meses, encontra-se de acordo com o esperado. A dieta a que o grupo controlo foi sujeito estava privada em DPA e só continha uma percentagem mínima de EPA. Assim, como os níveis dos precursores de síntese de DHA não foram suficientemente elevados, ocorre uma conversão limitada de DPA a DHA, o que se traduz no baixo aumento de DHA, conforme o citado na literatura (Raes *et al.*, 2004; Riley *et al.* 2000; Tórrres-Dúran *et al.*, 2006)

Os resultados obtidos para a variação de ácidos gordos ao longo da suplementação são os expectáveis, uma vez que o fígado é um órgão de reserva de gordura, e como tal os ratinhos alvo de suplementação foram sujeitos a um maior aporte deste ácidos gordos, o que se reflectiu num aumento de EPA e DPA.

Tórrres-Dúran e seus colaboradores observaram efeitos semelhantes na modificação da composição lipídica em fígado de ratinhos, após a suplementação com uma outra microalga (*A. maxima*) rica em ácidos gordos (Tórrres-Dúran *et al.*, 2006). Os resultados obtidos valorizam mais uma vez a potencialidade da incorporação de *D. vlkianum* na modificação da constituição dos ácidos gordos do fígado.

5.2.3. Composição percentual de ácidos gordos do Coração

O consumo de *D. vlkianum* demonstrou ter influência na composição lípidica do coração, registando-se um aumento significativo de EPA no grupo suplementado.

Os inúmeros estudos realizados ao longo dos anos com suplementação de EPA estabeleceram uma correlação directa entre o seu aumento e a prevenção do enfarte do miocárdio, acidentes cardiovasculares, doenças coronárias, diminuição da agregação plaquetária e redução dos factores de risco para o desenvolvimento da formação de trombos. (Albert *et al*, 2005; Burr *et al*, 1989; Dyerberg *et al*, 1975; Dyerberg *et al*, 1978; GISSI, 1999)

Deste modo, o aumento verificado de EPA, obtido através da suplementação com *D.vlkianum* afere para a potencialidade da sua incorporação na dieta humana traduzida em benefícios para a saúde.

Já a incorporação de DHA no coração não revelou alterações após a suplementação, o que pode ter origem nas suas propriedades estereoquímicas e conseqüente dificuldade na degradação (Burdge e Calder, 2005) Para além disso, a *pool* de DHA na microalga é menor face ao EPA o que pode ter influenciado os resultados obtidos. De qualquer modo, os resultados obtidos indiciam que o coração não é o órgão de deposição preferencial de DHA.

5.2.4. Composição percentual de ácidos gordos do Rim

Neste órgão não foram detectadas diferenças significativas para o EPA, DPA e DHA, o que sugere que o rim não é um órgão de preferencial bioincorporação dos mesmos.

Conforme o referido por Cha e Jones (1996), a selectividade da incorporação dos ácidos gordos nos tecidos depende precisamente do *status* de energia do animal e da composição em ácidos gordos de cada dieta em particular (Cha e Jones, 1996). Assim, verifica-se que as doses administradas de EPA e DHA não foram suficientes para que se registasse uma alteração da composição lípidica no rim.

Resultados idênticos foram obtidos por outros autores (Bandarra *et al*, 1997) em estudos com ratinhos alimentados com dietas suplementadas em 20% (w/w) de óleo de sardinha (EPA:18,6%± 0,12 e DHA:10,7%± 0,06) durante 6 meses

Observou-se ainda um efeito da suplementação contínua de *D. vlkianum* na diminuição da composição percentual de total de saturados. Como se sabe a elevada incorporação do total de SFA pode ser nefasta para o organismo e o facto da suplementação com *D. vlkianum* contribuir para esta diminuição é vantajoso em termos nutricionais e de saúde (Schmitz *et al*, 2008).

5.2.5. Composição percentual de ácidos gordos da Gordura Subcutânea

O tecido adiposo é o reservatório de todos os ácidos gordos essenciais e não essenciais incluindo os ómega-3, tanto de origem exógena como endógena. A análise do tecido adiposo é pois adequada para determinar a ingestão lípidica durante um período de tempo considerável (Baylin *et al.*, 2002; Beynen *et al.*, 1980; Scharm *et al.*, 2007).

A suplementação com *D. vlkianum* ressalta para o aumento da incorporação de EPA e $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ ao fim de 2 meses. Do mesmo modo, também Cha e Jones (1996) sugeriram que dietas ricas em PUFA n-3 podiam estimular o aumento da incorporação de EPA no tecido adiposo. A razão $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ permite concluir que a substituição dos ácidos gordos n-6 pelos n-3 foi significativamente aumentada com a ingestão de *D. vlkianum*.

O estudo realizado por Huang *et al.* (1990) mostrou ainda que uma dieta composta por 3% de óleo de peixe era suficiente para aumentar o teor de EPA e DHA no tecido adiposo de galinhas. No entanto, a suplementação efectuada neste estudo apenas se traduziu num aumento da composição percentual de EPA, o que pode ser consequência da menor percentagem de DHA na microalga

Os resultados obtidos sugerem então que a suplementação com *D. vlkianum* tem um efeito ao fim de 2 meses na mudança da composição lípidica do tecido adiposo.

Também se verificaram diferenças significativas para o EPA na análise realizada entre o início e fim de suplementação, sugerindo assim que a ingestão durante 2 meses de *D. vlkianum* continua a surtir efeito na modificação do perfil lípidico da gordura subcutânea.

5.2.6. Composição percentual de ácidos gordos da Gordura Visceral

O resultado obtido para o aumento significativo do EPA, consequência da suplementação sugere novamente a potencialidade do benefício da incorporação da *D. vlkianum* na dieta, como agente modificador da composição lipídica na gordura visceral.

O verificado para a gordura visceral é semelhante ao observado para a gordura subcutânea, o que seria de esperar, visto este tecido no seu conjunto ser o reflexo da dieta consumida. (Beynen *et al.*, 1980).

5.2.7. Comparação dos níveis de EPA, DPA e DHA nos diferentes órgãos e tecidos

Da análise da figura 30, salienta-se que a incorporação de EPA nos tecidos dos vários órgãos parece estar mais dependente do tipo de dieta do que a do DHA. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores (Raederstorff e Moser, 1992; Bandarra *et al.*, 1997) em estudos

com ratinhos alimentados com dietas suplementadas também em EPA e DHA. A suplementação com *D. vlkianum* parece ser eficaz na variação do perfil lipídico dos tecidos, pois são nos grupos suplementados que se verificam maiores níveis de EPA, DHA e DPA, o que de acordo com o descrito por inúmeros autores se traduz em benefícios associados à prevenção de doenças cardiovasculares, diminuição dos níveis de TAG no plasma, entre outros (Barrow *et al*, 2009; Haris e Schaky, 2004; Shidu, 2003).

Observa-se ainda que fígado é o órgão com maior percentagem de incorporação de EPA, DHA e DPA. Tal encontra-se de acordo com o esperado, visto o fígado ser o órgão responsável pela síntese e distribuição dos ácidos gordos (Bandarra *et al*, 1997). Seguidamente, é nos eritrócitos que se registam percentagens mais elevadas de EPA, DPA e DHA.

O tecido adiposo (gordura subcutânea e visceral) não representa uma fonte de EPA ou DHA para as necessidades corporais. Segundo a literatura a incorporação destes compostos é pouco representativa neste tecido (0,1%), daí que os seus níveis de incorporação sejam inferiores aos verificados para os demais órgãos (Baylin *et al* 2002; Burdge and Calder, 2005)

Outros autores sugerem ainda que se verificam menores teores de EPA, DPA e DHA na gordura subcutânea face a outros tipos de tecidos, devido ao baixo conteúdo em fosfolípidos, pois nestes órgãos a incorporação de ácidos gordos é maioritariamente em TAG (Sardi *et al*, 2006).

No caso do DHA, Sardi *et al*. (2006) refere ainda que este apresenta especial afinidade para ser incorporado em tecidos como o músculo ou em órgãos como o fígado e coração, devido ao papel que desempenha no metabolismo oxidativo dos ácidos gordos, o que se encontra de acordo com os resultados obtidos.

5.2.8. Composição em ácidos gordos na Análise Fecal

A excreção do conjunto de SFA, MUFA, PUFA, $\Sigma n-3$ e $\Sigma n-6$ parece ser semelhante nos dois grupos. Contudo quando comparados, registam-se diferenças significativas.

Existe ainda ao longo do tempo uma maior eliminação do $\Sigma n-6$ no grupo suplementado, podendo este resultado associar-se ao consumo de *D. vlkianum*.

A análise estatística entre o primeiro e último dia de excreção revela a existência de diferenças significativas.

Devido à variabilidade biológica dos seres vivos, os resultados encontram-se de acordo com o esperado, na medida em que o modo diferencial da excreção lipídica e do seu metabolismo pode ter origem intrínseca e não permitir a correlação com a dieta adoptada.

5.3. Optimização da metodologia de extrac o de carotenóides

Devido à complexidade da estrutura e   variedade de carotenóides existentes entre frutos e vegetais, ainda não se estabeleceu um método de referência para a sua análise (Quirós e Costa, 2006).

Na optimiza o do método teve-se em conta a sua precisão e exactidão o que envolveu a escolha do melhor método de extrac o de carotenóides, selec o da coluna, escolha da fase móvel e posterior verifica o da precisão e exactidão da metodologia adoptada (Semeraro *et al*, 2009).

A técnica de HPLC foi escolhida por permitir maior capacidade de resolu o e rapidez de análise, quando comparada com outras técnicas cromatográficas. Também a reprodutibilidade dos resultados obtidos é superior comparativamente a outras técnicas, pois os parâmetros que afectam a eficiência da separa o podem ser controlados de perto. Esta técnica foi simultaneamente escolhida, pois permite analisar amostras pouco voláteis ou termolábeis (Rodríguez-Amaya, 2001).

A escolha da coluna incidiu sobre uma coluna C18 Phenomenex 250 x 4,60nm ID e com tamanho de partículas de 5 m, de fase reversa (fase móvel mais polar que fase estacionária), anteriormente utilizada por outros autores para determina o do perfil de carotenóides *Chlorella vulgaris* (Gouveia *et al*, 1996). Como neste tipo de colunas a fase estacionária se encontra ligada com sílica gel a um octadecil, o mecanismo de separa o torna-se menos destrutível, o que previne a degrada o e instabilidade dos pigmentos durante a cromatografia, favorecendo uma melhor separa o entre os compostos polares, como   o caso dos carotenóides (Rodríguez-Amaya, 2001).

Sabendo ainda que os compostos a determinar possuíam uma elevada polaridade, foi necessário evitar a sua co-elui o. A coluna C18 polimérica apresenta por isso uma excelente selectividade para os is meros de posi o existentes nos carotenóides (luteína e zeaxantina) (Konings e Roomans, 1997). A escolha desta coluna garantiu assim uma maior robustez, reprodutibilidade e versatilidade de utiliza o e tal como observado foi eficiente na separa o da luteína e zeaxantina (Rodríguez-Amaya, 2001).

A selec o da fase móvel foi feita tendo em conta alguns parâmetros preliminares, nomeadamente a viscosidade, toxicidade, polaridade e volatilidade.

O acetonitrilo é amplamente utilizado nas determina es de carotenóides, por possuir uma baixa viscosidade e por apresentar uma selectividade ligeiramente superior para xantófilas quando se usa uma coluna C18 polimérica (Rodríguez-Amaya, 2001). Optou-se então por uma fase móvel com baixa volatilidade constituída por acetonitrilo e acetato de etilo (93:7 v/v) face a outras fases móveis experimentadas. A sua elevada polaridade ( ndice de polaridade de

acetonitrilo 5,8 e 4,4 índice de polaridade do acetonitrilo) reflectiu-se numa capacidade de melhoramento de separação dos carotenóides.

Após várias tentativas com eluições isocráticas, a eluição com gradiente associada a coluna escolhida foi a única, que se possibilitou a separação dos isómeros geométricos de luteína e zeaxantina, o que seria de supor tendo em conta a literatura pesquisada. Como referido na literatura a eluição com gradiente revelou um maior poder de resolução e sensibilidade (Rodríguez-Amaya, 2001).

O método de extracção de carotenóides escolhido foi adoptado do método seguido por Prates *et al*, (2006). Este método foi seleccionado em detrimento de outros por ser o que demonstrou melhor extracção de carotenóides.

Os principais parâmetros a ter em conta na optimização deste método foram a precisão, a repetibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e o intervalo linear (Semeraro *et al*, 2009).

Como verificado na tabela 2, os valores de linearidade obtidos para os diferentes padrões (linearidade luteína- 0,980; linearidade zeaxantina- 0,984; linearidade astaxantina- 0,986 e linearidade β -caroteno-0,987) encontram-se um pouco abaixo do descrito por Dias *et al*. (2008) ($r \geq 0,9985$), encontrando-se contudo, dentro dos níveis considerados aceitáveis por Kimura e Rodríguez-Amaya (2002) ($r \geq 0,95$) (Dias *et al*, 2008; Kimura e Rodríguez-Amaya, 2002). Deste modo, pode-se dizer que o método escolhido apresenta uma linearidade razoável para os padrões em causa, verificando-se uma maior linearidade ($r=0,987$) para o padrão de β -caroteno.

Ainda na análise dos resultados obtidos, constata-se que o melhor LD (concentração mais baixa a que um analito consegue reproduzir um sinal significativamente diferente do sinal do ruído produzido pelo aparelho) e LQ (valor mais baixo no qual o composto a identificar consegue ser quantificado com um certo limite de confiança) foram obtidos para a zeaxantina (LD= 0,150 $\mu\text{g/mL}$) (LQ=0,503 $\mu\text{g/mL}$). Os valores encontrados de LD e LQ para o padrão da luteína, zeaxantina e β -caroteno encontram-se um pouco aquém da sensibilidade obtida por métodos alternativos descritos pela literatura pesquisada (Dias *et al*, 2008). A mesma referência mostra que os limites de quantificação devem estar no limiar de 1 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de carotenos nas matrizes alimentares, contudo os valores obtidos (valores não demonstrados) encontram-se longe deste valor, o que pode ser devido ao volume de recuperação utilizado, ou também à existência de interferências nas matrizes (Dias *et al*, 2008; Semeraro *et al*, 2009). No entanto, os LD e LQ determinados não invalidam a detecção e quantificação necessária para a pesquisa de carotenóides nas amostras em questão.

Relativamente à aferição da repetibilidade, constata-se tal como o referido na literatura valores inferiores a 11% (Semeraro *et al*, 2009).

Os tempos de retenção obtidos para os diferentes padrões encontram-se de acordo com o esperado numa separação cromatográfica em fase reversa. O primeiro composto a ser eluído foi a astaxantina (tempo de retenção aproximadamente 11 minutos), devido à baixa interacção estabelecida com a fase estacionária. Por sua vez, o β -caroteno é o que apresenta maior tempo de retenção (aproximadamente 30 minutos), pois é o composto menos polar e como tal, o que estabelece maior interacção com a fase estacionária, pelo que só é eluído mais tarde. Os resultados obtidos encontram-se com o anteriormente verificado na literatura (Gouveia *et al*, 1996).

5.4. Análise da presença de carotenóides na ração e na *Chlorella vulgaris*

O teor de carotenóides totais na *Chlorella vulgaris* em peso seco (1,24 mg/g), é notavelmente inferior em comparação com microalgas como a *Dunaliella salina* (131,4 mg/g), *Chlorella ellipsoidea* (46,9 mg/g), *Scenedesmus dimorphus* (47,5mg/g) e *Scenedesmus actutus* (47,5 mg/g) (Abdel-Baky, 2002). Este valor não era expectável, pois a microalga durante a sua fase de crescimento foi sujeita a stress salino, o que implicaria a maior produção de carotenóides por este microrganismo. O baixo teor determinado pode ser consequência das sucessivas lavagens a que a *C. vulgaris* foi sujeita para eliminação do excesso de sal, o que provavelmente potenciou a eliminação de carotenóides.

De acordo com Gouveia *et al*, (1996) seria de esperar o seguinte perfil de carotenóides da *Chlorella vulgaris*: neoxantina, violaxantina, luteína, clorofila a, clorofila b, β -caroteno, astaxantina, cantaxantina e ésteres de astaxantina. Visto o perfil determinado por estes autores ter sido obtido com recurso a HPLC de fase reversa e com uma coluna C18 polimérica, seria esperado a obtenção de um perfil semelhante, o que se verificou (Gouveia *et al*, 1996). Porém, o perfil obtido para a *C. vulgaris* ficou incompleto, devido à inexistência de padrões presentes na no perfil de carotenóides indicado por Gouveia *et al*. (1996). De qualquer modo, assim como verificado por Gouveia *et al*, (1996) também no perfil de carotenóides obtido se observa a presença de astaxantina (54,72%), luteína (14,43%), zeaxantina (6,46%) e β -caroteno (4,80%).

Feita a analogia com os tempos de retenção obtidos por Gouveia *et al*, (1996) na determinação do perfil de carotenóides para a *Chlorella vulgaris* pode-se considerar que o pico obtido aos 14,321 min corresponde a clorofila a e o pico obtido aos 11,07 min a violaxantina. (Gouveia *et al*, 1996).

Relativamente à análise de carotenóides na ração, como não houve evidência da detecção dos mesmos, é possível inferir que o grupo controlo não foi alvo de ingestão de carotenóides.

5.5. Análise da presença de carotenóides nos órgãos e tecidos recolhidos

A análise feita aos órgãos recolhidos no final do estudo (1 mês) quer do grupo controlo quer do grupo sujeito a suplementação, não evidencia a incorporação de carotenóides nos mesmos. Existem diversas explicações plausíveis para os resultados obtidos, discutidas de seguida.

Um estudo recente efectuado por Rao *et al.* (2010) sugere que a incorporação de carotenóides no plasma e fígado, após a sua ingestão atinge um máximo para os diferentes pigmentos carotenóides (astaxantina, luteína e β -caroteno) ao fim de 2 horas. Verificaram ainda que a concentração dos compostos diminuía ao longo do tempo, registando-se mínima ao final das 9 horas (Rao *et al.*, 2010). Tendo em linha de conta o estudo referido anteriormente, o facto de não ter sido determinada a presença de carotenóides nas amostras, sugere que a quantidade ministrada de microalga não foi suficiente para que tivesse ocorrido incorporação dos mesmos nos órgãos e tecidos analisados.

O processamento dos alimentos parece simultaneamente ter influência na biodisponibilidade de carotenóides. O modo de confecção dos alimentos, por exemplo, pode levar à ruptura de ligações entre os compostos aumentando desta forma a sua absorção. Assim, quando os alimentos são cozinhados, o seu processamento conduz à libertação de carotenóides das ligações moleculares, tornando-os mais acessíveis para a respectiva absorção nos diferentes tecidos (Furr e Clark, 1997). Posto isto, como a administração de *Chlorella vulgaris* não foi sujeita a nenhum processamento específico, apenas se preparou uma suspensão aquosa, esta pode ter sido uma causa para que não tenha ocorrido incorporação de carotenóides nos diferentes órgãos analisados. A bioincorporação pode ter sido também influenciada pela localização dos pigmentos carotenóides na microalga como citado na literatura (Paiva e Russell, 1999).

A inexistência de carotenóides nos tecidos e órgãos analisados, pode também ser devida, tal com a literatura refere à competição gerada pelos carotenóides durante a absorção. (Vargas-Delgado, 2000).

Diversos trabalhos apontam para a competição gerada pelo β -caroteno na absorção e metabolismo de outros carotenóides. Furr e Clark (1997) observaram por exemplo que indivíduos suplementados com cerca de 12 a 30 mg de β -caroteno durante 6 semanas apresentavam diminuição plasmática na concentração de luteína em 40%, o que pode ter tido também influência nos resultados obtidos (Furr e Clark, 1997; Parker, 1996).

Vários estudos epidemiológicos e clínicos demonstraram ainda que a absorção de carotenóides é extremamente variável de indivíduo para indivíduo, encontrando-se relacionada com factores exógenos como a dieta, ou a ingestão simultânea de medicamentos, bem como o

status nutricional do indivíduo (Paiva e Russell, 1999; Perera e Yen, 2007; Vargas-Delgado, 2000).

Para além do que foi referido anteriormente, a falha da aferição de carotenóides nos órgãos de ratinhos suplementados, pode ter origem na metodologia adoptada. Assim, os LD e LQ determinados para os diferentes compostos podem não ser suficientes baixos para quantificar a sua presença.

Caso tivesse ocorrido incorporação de carotenóides, seria de esperar uma quantificação superior no fígado e o tecido adiposo. Segundo Bendich e Olson, (1989) a incorporação maioritária de carotenóides ocorre primariamente no tecido adiposo (80-85%), e no fígado (8-12%), e só então distribuído para outros tecidos. De referir ainda que o total de concentração de carotenóides presente na corrente sanguínea e nos tecidos dependente das doses ingeridas na dieta (Bendich e Olson, 1989).

5.6. Análise da presença de carotenóides nas amostras fecais

A análise das fezes recolhidas diariamente do grupo de ratinhos suplementados, permite de certa modo verificar que os carotenóides não estão a ser absorvidos, mas a sofrer excreção

Assim, a observação gráfica da figura 36 insinua que a eliminação dos quatro pigmentos estudados com ligeira excepção para o β -caroteno é muito semelhante, o que foi confirmado pela ausência de diferenças estatisticamente significativas.

Comum aos 4 pigmentos, a eliminação como seria de esperar é menor no início aumentando ao longo do tempo de suplementação, visto o aporte de carotenóides a que os ratinhos foram sujeitos ser superior com o avançar do estudo.

Por sua vez, os resultados obtidos revelam que nos 4 pigmentos a excreção entre o 1º dia e o final do estudo é estatisticamente significativa, o que sugere que no final do estudo se inicia uma incorporação dos mesmos nos diferentes órgãos e tecidos.

Na análise fecal dos ratinhos controlo não se observa excreção de carotenóides, conforme o esperado, pois este grupos apenas consumiu ração.

As diversas diferenças existentes entre o modelo animal adoptado e o ser Humano requerem cuidados imprescindíveis na extrapolação dos resultados obtidos. Nos humanos e alguns animais como os cavalos, a conversão de β -caroteno em vitamina A atinge os 15%, enquanto que a conversão do mesmo composto se processa de forma mais eficaz nos ratinhos. Assim, este rápido processamento de β -caroteno em vitamina A pode influenciar os resultados obtidos, na medida em que o β -caroteno ministrado na suplementação ser rapidamente convertido em vitamina A, daí que não seja quantificado (Perera e Yen, 2007).

Siqueira *et al.* (2007) alerta simultaneamente para a incapacidade deste modelo animal em não absorver o β -caroteno na sua forma intacta quando administrado em doses orais

fisiológicas (Siqueira *et al*, 2007). Devido ao que foi referido anteriormente, alguns autores consideram que este não é um modelo apropriado para estudar a biodisponibilidade de carotenóides, sugerindo como alternativas o desenvolvimento de estudos em porcos ou coelhos. Apesar de tudo, estudos comparativos da biodisponibilidade dos carotenóides, utilizando ratinhos são deveras úteis no que diz respeito ao estudo da matriz alimentar (Siqueira *et al*, 2007).

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Com o avançar dos conhecimentos sobre os benefícios do EPA e DHA na saúde torna-se importante dar continuidade aos estudos sobre os seus efeitos prolongados e aspectos bioquímicos destes compostos. Para além disso, devido à crescente contaminação dos mares, a obtenção de EPA/DHA como alternativa às cápsulas de peixe torna-se muito exequível. Daí que as microalgas sejam vistas como potenciais fontes para estes compostos. São ainda necessários mais estudos com placebos e microalgas para observar os seus efeitos a nível cardiovascular. É também importante que concomitantemente seja promovida a educação para o público em geral dos benefícios da ingestão de ómega-3.

Tendo em conta os resultados obtidos nos diferentes tecidos e órgãos, seria interessante numa análise posterior, ou aumentar a dose administrada diariamente ou ainda aumentar a duração do estudo para melhor compreender os efeitos da incorporação dos diferentes ácidos gordos nos órgãos e tecidos em estudo.

Outro aspecto a ter em conta em análises futuras é a localização estrutural de ácidos gordos na microalga *Diacronema vlkianum*, uma vez que a posição dos mesmos ainda se encontra por identificar, e como tal, o facto de se encontrarem na posição sn-1, sn-2 ou sn-3 pode ser determinante para a melhor compreensão dos resultados obtidos, isto é se ocorre ou não absorção dos ácidos gordos por parte do organismo. Sabe-se pois que a melhor incorporação dos ácidos gordos ocorre quando estes se encontram na posição sn-3, e por isso mesmo, o facto de se encontrar determinada a posição dos respectivos ácidos gordos, permitiria uma melhor análise dos resultados obtidos.

Relativamente ao estudo da suplementação de carotenóides na dieta com incorporação da microalga *Chlorella vulgaris*, visto um mês não ter sido o suficiente para que se observasse a incorporação dos mesmos nos órgãos e tecidos analisados, seria essencial alargar o tempo de estudo ou a administração de uma maior dose diária de carotenóides. Outra hipótese plausível passaria também pela realização de um estudo semelhante em modelos animais diferentes dos que foram utilizados, visto o metabolismo de absorção e digestão de carotenóides variar consideravelmente de organismo para organismo. Dever-se-ia ainda proceder à determinação da análise de enzimas antioxidantes como a catalase, superóxido dismutase, peroxidases e produtos resultantes de fenómenos de peroxidação (exemplo: afeição de DNA oxidado nas células), de modo a avaliar a potencialidade dos efeitos antioxidantes resultantes da incorporação da *Chlorella vulgaris* na dieta. Por sua vez, a técnica de análise dos carotenóides utilizada deveria ser sujeita a validação para melhor garantia dos resultados que se obtêm. Outra abordagem possível seria a mudança de metodologia para determinação de carotenóides

7. CONCLUSÃO

O estudo da suplementação com *Diacronema vlkianum*, parece em geral ter influência no aumento significativo da incorporação de EPA, DPA no tecidos, indicando assim ser uma boa fonte de nutricional de ómega-3.

Relativamente ao método de HPLC com vista a analisar os compostos de astaxantina, luteína, zeaxantina e β -caroteno nas amostras, foi genericamente optimizado, tendo em conta as práticas de validação dentro do laboratório e respeitando as linhas internacionais.

Quanto à incorporação da *Chlorella vulgaris* na dieta humana, os resultados obtidos não foram conclusivos para a possível adopção da microalga como fonte de obtenção de carotenóides, uma vez que não se verificou a incorporação de carotenóides nos diversos órgãos analisados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

- Abdel-Baky H., *et al.* (2002). “Chemoprevention of Penzo [a]pyrene-induced Carcinogen and Lipid Peroxidation in Mice by Lipophilic Algae Extracts (Phycotene)”; *J. Med. Sci.*, **2**: 185-193.
- Abuissa H., *et al.* (2005) “Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors or Angiotensin Receptor Blockers for Prevention of Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials”; *Journal of the American College of Cardiology*, **46**: 821-826.
- Albert, C. M., *et al.* (2005). “Dietary {alpha} - Linolenic Acid Intake and Risk of Sudden Cardiac Death and Coronary Heart Disease”. *Circulation* **112**: 3232-3238.
- Ambrosi M., *et al.* (2008). “Propriedades de saúde da microalga *Spirulina*”; *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, **29**: 115-123.
- Arterburn L. *et al.* (2006) “Bioavailability and safety of a high dose of docosahexaenoic acid triacylglycerol of algal origin in cystic fibrosis patients: a randomized, controlled study”; *Nutrition*, **22**, 1:6-46.

B

- Baker, R. e Gunter, C. (2004). “The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption”; *Trends in Food Science & Technology*, **15**:484-488.
- Bandarra N. *et al.* (1997) “Influence of sardine oil supplements on fatty acid profile and cholesterol levels in the rat”; *Seafood from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality*. Eds. J.B. Luten, T. Borresen e J. Oehlenschläger. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, pp. 609-619.
- Bandarra, N. *et al.* (2002). “The production of α -tocopherol, sterols and fatty acids by three marine microalgae”; *Natural Products in the New Millenium: Prospects and Industrial Application*; *Klumer Academic Publishers*; 483-493.
- Barrow J. *et al.* (2009). “Bioequivalence of encapsulated and microencapsulated fish-oil supplementation”; *Journal of functional Foods*, **1**: 38-43.
- Baylin A. *et al.* (2002) “Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake”; *Am. J. Clin. Nutri.*, **76**:750-757.
- Beelen A. *et al.* (2009). “An n-3 PUFA-rich microalga oil diet protects to a similar extent as a fish oil-rich diet against AOM-induced colonic aberrant crypt foci in F344 rats”; *Food and Chemical Toxicology* **47**: 316-320.
- Becker, E. W. (2004). “Microalgae in human and animal nutrition: Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology”. London: Blackwell Science, pp.312-351.
- Behrens P. e David K. (1996) “Microalgae as a source of Fatty Acids”; *Journal of Food Lipids*, **3** 259-272.

- Bendich A. e Olson J. (1989) “Biological actions of carotenoids” *The FASEB Journal*, **3**:1927-1932.
- Beynen C, *et al* (1980) “A mathematical relationship between the fatty acid composition of the diet and adipose tissue in man”; *Am. J. Clin. Nutr.*, **33**: 81-5.
- Blum R., *et al.* (2007) “Genotoxicity and subchronic toxicity studies of DHA-rich oil in rats”; *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **49**:271–284.
- Borowitzka M. A. (1999). “Commercial production of Microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters”; *Journal of Biotechnology*, **70**: 313–321.
- Bourre M. (2005) “Dietary omega-3 Fatty acids and psychiatry: mood, behavior, stress, depression, dementia and aging”; *J. Nutr. Health Aging*; **9**:31-8.
- Brambilla, D., *et al.* (2008) “The role of antioxidant supplement in immune system, neoplastic, and neurodegenerative disorders: a point of view for an assessment of the risk/benefit profile”; *Nutrition Journal*, **7**:29.
- Britton G. (1995) “Structure and properties of carotenoids in relation to function”; *Easier Journal*, **9**:1551-1558.
- Brown, M.R. (1991). “The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture”; *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **145**: 79-99.
- Burdge C. e Calder C. (2005). “Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults”; *Reprod Nutr Dev.* **45**:581-97.
- Burr M.L., *et al.* (1989). “Diet and reinfarction trial (DART): design, recruitment, and compliance”; *European Heart Journal*, **10**: 558-567.

C

- Calder P. (2004) “Long-chain n-3 fatty acids and cardiovascular disease: further evidence and insights”; *Nutrition Research*, **24**:761-772.
- Calder P. (2004) “ n-3 fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored”; *Clinical Science*, **107**:1-11.
- Calder P. (2006) “Polyunsaturated fatty acids and inflammation”; *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **75**: 197-202.
- Cannon D. (2009) “From fish oil to microalgae oil . . . a win-winshift for humans and our habitat”; *Diet and Nutrition*, **5**: 299-303.
- Cao D. *et al* (2004) “Protective effect of chronic ethyl docosahexaenoate administration on brain injury in ischemic gerbils” *Pharmacol. Biochem. Behav.* **79**:651–659.
- Certik, M. e Shimizu, S. (1999) “Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production”; *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **87**:1-14.
- Cha M. e Jones P. (1996) “Tissue fatty acid deposition is influenced by an interaction of dietary oil source and energy intake level in rats”; *Nutritional Biochemistry*, **7**: 655-658

Chen, J. *et al* (1998). “ α -tocopherol content and oxidative stability of egg yolk as related to dietary α -tocopherol”; *Journal of Food Science*, **63**: 207-214.

Chong, E., *et al.* (2007) “Dietary antioxidants and primary prevention of age related macular degeneration: systematic review and meta-analysis”; *BMJ*., 335: 755.

Conquer J. e Holub B. (1996)“Supplementation with an Algae Source of Docosahexaenoic Acid Increases (n-3) Fatty Acid Status and Alters Selected Risk Factors for Heart Disease inVegetarian Subjects”; *Human and Clinical Nutrition*, **126**:3032-3039.

D

Das, U. (2000) “Beneficial effect(s) of n-3 fatty acids in cardiovascular diseases: but, why and how?”; *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **63**: 351-362.

Day, G., *et al.* (2009). “Safety evaluation of a high-lipid algal biomass from *Chlorella protothecoides*”; *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **55**:166–180.

Del Campo, J. *et al.* (2007). “Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives”; *Appl. Microbiol. Biotechno*, **74**:1163–1174.

Derner R., *et al* (2006) “Microalgae, products and applications”; *Ciência Rural*, **36**:1959-1967.

Dias M., *et al.* (2008) “Uncertainty estimation and in-house method validation of HPLC analysis of carotenoids for food composition data production”; *Food chemistry*, **109**: 815-824.

Dias M. *et al* (2009) “Carotenoids in traditional Portuguese fruits and vegetables”; *Food Chemistry*, **113**: 808-815.

Diplock, T., *et al.* (1999) “Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document”; *J. Nutr.* **81**: IS1-S27.

Dixon R., *et al.* (1998) “The Effect of a Low Carotenoid Diet on Malondialdehyde-Thiobarbituric Acid (MDA-TBA) Concentrations in Women: A Placebo-Controlled Double-Blind Study;” *Journal of the American College of Nutrition*, **17**:54–58.

Donato, M., *et al.* (2003) “Fatty Acids, sterols, α -tocopherol and total carotenoids composition of *Diacronema vlkianum*”; *Journal of Food Lipids*, **10**: 267-276.

Doughman S. *et al.* (2007) “Omega-3 Fatty Acids for Nutrition and Medicine: Considering Microalgae Oil as aVegetarian Source of EPA and DHA”; *Current Diabetes Reviews*, **3**: 198-203.

Dyall, S. C., e Michael-Titus, A. T. (2008). “Neurological benefits of omega-3 fatty acids”. *Neuromolecular Medicine*, **4**:219-235.

Dyerberg J., *et al.* (1975) “Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos”; *American Journal of Clinical Nutrition*, **28**: 958-966.

Dyerberg J., *et al.* (1978) “Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis?”; *Lancet*, **2**: 336-344.

E

Engler M. *et al.* (1999) “The effects of a diet rich in docosahexaenoic acid on organ and vascular fatty acid composition in spontaneously hypertensive rats”; *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **61**: 289-295.

F

Fidalgo J. P., *et al.* (1998) “Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*”; *Aquaculture*, **166**:105-116.

Fujitani, N., *et al.* (2001) “Inhibitory effects of microalgae on the activation of hyaluronidase”; *Journal of Applied Phycology* **13**: 489–492.

Furr H. e Clark R. (1997) “Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids”; *Nutritional Biochemistry*, **8**:364-377.

G

Garofolo A. e Petrilli S. (2006) “Omega-3 and 6 fatty acids balance in inflammatory response in patients with cancer and cachexia”; *Rev. Nutr. Campinas*, **19**:611-621.

Gouveia L., *et al.* (1996) “Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*”; *Bioresource Technology*, **57**: 157-163.

Gouveia L., *et al.* (2008) “Functional biscuits with PUFA- ω 3 from *Isochrysis galbana*”; *Food and Agriculture J, Sci. Food Agric.*,**88**: 891–896.

Gouveia, L., *et al.* (2008) “*Spirulina maxima* and *Diacronema vlkianum* microalgae in vegetable gelled desserts”; *Nutrition & Food Science*, **38**: 492-501.

Grima M., *et al.* (1995) “The Production of Polyunsaturated Fatty Acids by Microalgae: from Strain Selection to Product Purification”; *Process Biochemistry*, **30**: 711-719.

Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto. (1999) “Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial”; *Miocardico. Lancet*, **354**: 447-55.

Guerin, M., *et al.* (2003) “*Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition”; *Trends in Biotechnology*, **21**:210-216.

Guschina I. e Harwood J. (2006) “Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae”; *Progress in Lipid Research*, **45**:160–186.

H

Harris W. e Schacky C. (2004). “The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease?”; *Preventive Medicine*, **39**: 212– 220.

He K., *et al.* (2004) “Accumulated Evidence on Fish Consumption and Coronary Heart Disease Mortality”; American Heart Association, **109**: 2705-2711.

He, X., *et al.* (2007), “Effects of different dietary oil sources on immune function in cyclophosphamide immunosuppressed chickens”; *Animal Feed Science and Technnology*, **139**: 186-200.

Henriques, M. *et al.*, (1998) “*Dunaliella*: uma fonte natural de β -caroteno com potencialidades de aproveitamento biotecnológico”; *Boletim de Biotecnologia*, **61**: 12-18.

Hodson L., *et al.* (2002) “Stability of plasma and erythrocyte fatty acid composition during cold storage”; **321**: 63-67.

Hooper L., *et al.* (2006) “Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review”; *BMJ*, **332**: 752-755.

Hu, Q., *et al.*, (2008) “Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances”; *Plant. J.* **54**:621-39.

Huang Z. *et al.* (1990) “Effect of oxidized dietary fish oil on omega 3 fatty acid levels in chicken eggs and thigh flesh”; *J. Agric. Food Chem.*, **38**: 743-747.

I

Innis S.M. (2005) “Essential fatty acid transfer and fetal development”; *Placenta*, **26**:S70-S75.

K

Katan M. (1997) “Dietary fatty acids and the prevention of cardiovascular disease”; *Atherosclerosis*, **134**, 1-2:103.

Kim, H-K., *et al.* (2009) “Protective Effects of *Chlorella vulgaris* Extract on Carbon Tetrachloride-induced Acute Liver Injury in Mice”; *Food Science and biotechnology*, **18**:1186-1192.

Kimura, F., *et al.* (2005) “Administration of two oils rich in n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids to rat pups of dams fed a diet high in fat and low in n-3 polyunsaturated fatty acids”; *Fisheries Science*, **71**:431–440.

Kimura B. e Rodriguez-Amaya D. (2002) “A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids”; *Food Chemistry*, **78** : 389–398.

Konings E. e Roomans H., (1997) “Evaluation and validation of an LC method for the analysis of carotenoids in vegetables and fruit”; *Food chemistry*, **59**:599- 603.

Kruger M. e Schollum L., (2005) “Is docosahexaenoic acid more effective than eicosapentaenoic acid for increasing calcium bioavailability?”; *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **73**: 327-334.

Kurowska M., *et al.* (2003) “Bioavailability of omega-3 essential fatty acids from perilla seed oil”; *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **68**: 207–212.

L

Lee S., *et al.* (2010) “Six-week supplementation with *Chlorella* has favorable impact on antioxidant status in Korean male smokers”; *Nutrition* **26**:175–183.

Lepage, G. e Roy, C., (1986). “Direct transesterification of all classes of lipids in one-step reaction”; *J. Lipid Res.*, **27**, 114-119.

Lien E. (2009) “Toxicology and safety of DHA”; *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **81**:125–132.

M

Mazza M. *et al.*, (2007) “Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric diseases: An overview”; *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **31**: 12-26.

Medina R., *et al.*, (1998) “Polyunsaturated Fatty Acids”; *Biotechnology Advances*, **16**: 517-580.

Medina R., *et al.* (1999) “ Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils”; *Journal of Biotechnology*, **70**: 379-391.

Mogedas, B., *et al.* (2009) .“β-Carotene production enhancement by UV-A radiation in *Dunaliella bardawil* cultivated in laboratory reactors”; *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **108**: 47–51.

Morris M. *et al.* (1993) “Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials,” *Circulation*, **88**:523-533.

Moyad M. (2005) “An introduction to dietary/supplemental omega-3 fatty acids for general health and prevention: Part I”; *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, **23**: 28-35.

Mozaffarian D., *et al.* (2004). “Fish Intake and Risk of Incident Atrial Fibrillation” *Circulation*, **110**:368-3703.

Murthy, N., *et al.* (2005) “Comparative evaluation of hepatoprotective activity of carotenoids of microalgae”; *J. Med. Food*, **8**:52.

Mu H. e Høy C. (2004) “The digestion of dietary triacylglycerols”; *Progress in Lipid Research*, **3**: 105-133.

N

Nakamura T. e Nara Y. (2003) “ Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals”; *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential fatty Acids*, **68**:145-150.

Nordoy A., *et al.* (1993) “Individual effects of dietary saturated fatty acids and fish oil on plasma lipids and lipoproteins in normal men”, *American Journal of Clinical Nutrition*, **57**: 634-639.

Nelson, L., e Cox, M. (2005) “Lehninger Principles of Biochemistry”; W. H. Freeman and Company (4ª edição), EUA pp:343-363; 631-637.

O

Ota, M. *et al.*,(2009) “Carotenoid production from *Chlorococcum littorale* in photoautotrophic cultures with downstream supercritical fluid processing”; *J. Sep. Sci.* **32**:2327 – 2335.

P

Paiva, S. e Russell R. (1999) “Review Series: Antioxidants and their Clinical Applications β -Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants”; *Journal of the American College of Nutrition*; **18**: 426–433.

Parker R. (1996). “Absorption, metabolism, and transport of carotenoids”; *Serial Reviews Carotenoids*, **4**:542-551.

Perera, O. e Yen, M. (2007) “Functional Properties of Carotenoids in Human Health, International”; *Journal of Food Properties*, **10**: 201–230.

Plaza, M., *et al*, (2009) “Screening for bioactive compounds from algae”; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **51**: 450-455.

Plaza, M., *et al*, (2009) “Innovative Natural Functional Ingredients from Microalgae”; *J. Agric. Food. Chem.* **57**:7159–7170.

Prates J. *et al* (2006) “Simultaneous HPLC quantification of total cholesterol, tocopherols and β -carotene in Barrosã-PDO veal”; *Food Chemistry*, **94**: 469-477.

Prisco *et al.* (1996) “n-3 PUFA supplementation, monocyte PCA expression and interleukin-6 production”; *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **54**, 6: 439-444.

Pulz, O. e Gross, W. (2004) “Valuable products from Biotechnology of microalgae”; *Applied Microbiology Biotechnology*, **65**:635-648.

Q

Quirós A. e Costa H. (2006) “Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review”; *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**: 97-111.

R

Raederstorff D. *et al.* (1992) “Influence of na increased intake of linoleic acid on theincorporation of dietary (n-3) fatty acids in phospholipids and so prostanoid synthesis in rat tissues”; *Biochim. Biophys*, 1165:194-200.

Ramírez M. *et al.* (2001) “Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources”; *Early Human Development*, **65**:95–101.

Ramadan, M. e Morsel, J-T., (2002) “Analysis of glycolipids from black cumin (*Nigella sativa L.*) coriander (*Coriandrum sativum L.*) and niger (*Guizotia abyssinica Cass*) oilseeds”; *Food Chemistry* **80**: 197-204.

Ramel A. *et al.* (2008) “Beneficial effects of long-chain n-3 fatty acids in an energy-restricted diet on insulin resistance in overweight and obese European young adults.” *Diabetologia*, **51**:1261-1268.

Raes K. *et al*, (2004) “Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review”; *Animal Feed Science and Technology*, **113**, 1: 199-221.

- Rao V. e Rao G. (2007) “Carotenoids and human health” ; *Pharmacological Research*, **55**: 207–216.
- Rao A. *et al.* (2010) “Characterization of Microalgal Carotenoids by Mass Spectrometry and Their Bioavailability and Antioxidant Properties elucidated in Rat Model”; *J. Agric. Food Chem.*, **58**: 8553–8559.
- Riccioni, G. (2009) “Carotenoids and Cardiovascular Disease”; *Current Atherosclerosis Reports*, **11**:434–439.
- Riley *et al.* (2000) “Effects of dietary linsedd on nutritional value and other quality aspects of pig muscle and adipose tissue”; *Animal Science*, **71**, 483-500.
- Rodriguez- Amaya D. e Sá M. (2004) “Carotenoids a Food Prospective”*Journal of Food Composition and Analysis* **17**: 37–51.
- Rodriguez-Amaya D. (2001) “A guide to carotenoid analysis in foods”, United States of America
- Rodriguez-Garcia, I. e Guil-Guerrero, L. (2008) “Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods”;;*Food Chemistry* **108**:1023–1026.
- S**
- Sánchez, S. *et al.* (2000) “Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium”; *Biochemical Engineering Journal*, **6**: 13-15.
- Sardi L., *et al.* (2006) “Effects of a dietary supplement of DHA-rich marine algae on Italian heavy pig production parameters”; *Livestock Science*, **103** : 95– 103.
- Scharm L., *et al.* (2007) “Food matrices affect the bioavailability of (n-3) polyunsaturated fatty acids in a single meal study in humans”; *Food Research International*, **40**:1062–1068.
- Schmitz H., *et al.* (1991) “Concentrations of Selected Carotenoids and Vitamin A in Human Liver, Kidney and Lung Tissue”; *The journal of Nutrition*, **121**: 1613-1621
- Schmitz, G. e Ecker, J. (2008) “The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids”; *Progress in Lipid Research*, **47**:147–155.
- Semeraro A., *et al.* (2009). “Evaluation of uncertainty of measurement from method validation data: An application to the simultaneous determination of retinol and α -tocopherol in human serum by HPLC”; *Journal of Chromatography B*, **877**:1209-1215.
- Siems, W., *et al.* (2005) “ β -carotene breakdown products may impair mitochondrial functions—potential side effects of high-dose β -carotene supplementation B”; *Journal of Nutritional Biochemistry*, **16**:385–397.
- Simopoulos A. P., (2002) “Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases”. *J. Am. Coll. Nutr.*, **21**:495-505.

- Siqueira, E. et al. (2007) “ β -Carotene from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaves improves vitamin A status in rats”; *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **146**: 235–240
- Shidhu, S. (2003) “Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil”; *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **38**: 336-344.
- Sommer *et al.* (1991) “The use of physical methods to locate metal ions in biological systems”; *Journal of Inorganic Biochemistry*, **43**:384.
- Shifrin, S., e Chisholm W. (1981) “Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycle”; *J. Phycol.*, **17**:374–384.
- Snider D., *et al* (2006) “Lipid metabolism I: Synthesis, storage, and utilization of fatty acids and triacylglycerols”; Delvin TM, ed. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, Wiley & Sons, pp.662-89.
- Sohemy, E., *et al.* (2002) “Individual carotenoid concentrations in adipose tissue and plams as biomarkers of dietary intake”; *Am. J. Clin. Nutr.*, **76**:172-179.
- Spolaore, P., *et al.*, (2006) “Commercial Applications of Microalgae”; *Journal of Bioscience and Bioengineering* **101**: 87–96.
- Stahl W. e Sies H. (1996) “Lycopene: a biologically important carotenoid for humans?”; *Arch. Biochem. Biophys*, **336**:1–9.
- Strobel, M., *et al* (2007) “The importance of b-carotene as a source of vitamin A with special regard to pregnant and breastfeeding women”; *Eur. J. Nutr.*, **46**:1–20.
- T**
- Tapiero, H., *et al.* (2004) “The role of carotenoids in the prevention of human pathologies”; *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **58**:100–110.
- Thies, F., *et al.* (2003) “Association of n-3 polyunsaturated fatty acids eith stability of atherosclerotic plaques: a randomized controlled trial”; *Lancet*, **361**:477-85.
- Thomas, R. (2006) “Vitamins in aging, health and longevity”; *Review Clinical Interventions in Aging*, **1**:81–91.
- Torres-Durán P., *et al.* (2006) “Protective Effect of *Arthrospira maxima* on Fatty Acid Composition in Fatty Liver”; *Archives of Medical Research*, **37**:479–483.
- Tourniaire, F., *et al.* (2009) “ β -Carotene conversion products and their effects on adipose tissue”; *Genes Nutr.*, **4**:179–187.
- V**
- Vargas-Delgado F., *et al.* (2000) “ Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains- Characteristics, Biosynthesis, Processing and Stability”; *Reviews in Food science and Nutrition*, **40**:172-289.
- Volkman, J. *et al* (1997) “Unusual dihydroxysterols as chemotaxonomic markers for microalgae from the order *Pavloales* (*Haptophyceae*)”; *J. Phycol.*, **33**: 1016-1023.

W

Wang C., *et al.* (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”; *Am. J. Clin. Nutr.*, **84**: 5–17.

Ward O. e Singh A. (2005) “Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production”; *Process Biochemistry*, 40 3627–3652.

Whelan, J. e Cheryl R. (2006) “Innovative Dietary Sources of N-3 Fatty Acids”; *Annual Reviews*, **26**:75–103.

Wijendran V. e Hayes C. (2004) “Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health”; *Annual Review of Nutrition*, **24**:597-615.

Y

Yeum K-J e Russell R. (2002) “Carotenoid Bioavailability and Bioconversion”; *Annu. Rev. Nutr.*, **22**:483–504.

ANEXOS

	Controlo (Ctrl)						Microalga (Micro)						Ctrl vs Micro (15 dias)		Ctrl vs Micro (2meses)	
	15 Dias		2 meses		Comparação (micro15 dias vs micro 2meses)		Análise estatística (15dias micro vs 2meses micro)		15 Dias		2 meses		Comparação (ctrl15 dias vs ctrl 2meses)		Análise estatística (15dias ctrl vs 2meses ctrl)	
	média	desvpad	média	desvpad			p-value 0,05 (*)		média	desvpad	média	desvpad			p-value 0,05 (*)	p-value 0,05 (*)
ERITRÓCITOS (RBC)																
14:0	0,24	0,07	0,28	0,04	↑			0,23	0,03	0,30	0,02	↑		*	↑	
16:0	25,71	0,17	24,30	0,72	↓		*	25,66	0,43	24,30	0,63	↓		*	(=)	
18:0	13,08	0,61	12,92	0,94	↓			12,95	0,37	13,03	0,62	↑			↑	
Outros Saturados	3,73	0,95	3,20	0,56	↓			4,35	0,36	3,14	0,37	↓		*	↓	
Total Saturados	42,51	0,62	40,42	0,58	↓		*	42,95	0,39	40,47	0,54	↓		*	↑	
16:1	1,06	0,33	1,18	0,34	↑			1,00	0,11	1,29	0,22	↑		*	↑	
18:1n-9	6,07	0,69	5,74	0,50	↓			5,90	0,61	6,05	0,51	↑			↑	
18:1n-7	3,30	0,22	3,29	0,28	↓			3,21	0,19	3,50	0,49	↑			↑	
Out MUFA	0,94	0,12	0,76	0,16	↓		*	1,11	0,18	0,71	0,07	↓		*	↓	
Total MUFA	12,84	1,22	11,57	0,93	↓			12,94	0,86	12,00	0,78	↓			↑	
18:2n-6	10,89	0,94	10,10	0,46	↓			10,17	0,43	10,54	0,68	↑			↑	
18:4n-3	0,23	0,04	0,10	0,09	↓		*	0,28	0,07	0,12	0,02	↓		*	↑	
18:3n-3	0,13	0,06	0,06	0,03	↓			0,10	0,02	0,09	0,01	↓			↑	
20:4n-6 (AA)	22,73	1,58	23,02	1,03	↑			22,67	0,77	20,53	0,80	↓		*	↓	*
20:5n-3 (EPA)	0,50	0,07	0,59	0,07	↑		*	0,63	0,07	1,32	0,11	↑		*	↑	*
22:5n-3 (DPA)	1,90	0,28	1,65	0,16	↓			1,96	0,08	2,32	0,10	↑		*	↑	*
22:6n-3 (DHA)	3,38	0,25	3,84	0,25	↑		*	2,97	0,08	3,73	0,25	↑		*	↑	*
Out PUFA	1,76	0,31	1,66	0,27	↓			1,91	0,30	1,63	0,09	↓			↓	
Total PUFA	43,40	0,46	43,21	1,37	↓			43,46	0,38	42,55	1,05	↓		*	↓	
Σn-3	8,75	0,83	9,05	0,28	↑			9,63	0,30	10,40	0,25	↑		*	↑	*
Σn-6	34,10	0,75	33,67	1,31	↓			33,31	0,53	31,63	0,99	↓		*	↓	*
Σn-3/Σn-6	0,26	0,03	0,27	0,01	↑			0,29	0,01	0,33	0,01	↑		*	↑	*

Tabela 1- Valores de média e desvio padrão para os respectivos ácidos gordos nos diferentes grupos em diferentes fases do estudo nos eritrócitos. (*- existência de diferenças significativas com $p\text{-value}<0,05$; ↑-aumento; ↓-decréscimo; (=)- mantido)

FÍGADO	Controlo (Ctrl)						Microalga (Micro)						Ctrl vs Micro (15 dias)		Ctrl vs Micro (2 meses)	
	15 Dias		2 meses		Comparação (ctrl15 dias vs ctrl 2meses)		Análise estatística (15dias ctrl vs 2meses ctrl)		15 Dias		2 meses		Comparação (micro15 dias vs micro 2meses)		Análise estatística (15dias micro vs 2meses micro)	
	Média	Desvpad	Média	Desvpad			p-value 0,05 (*)		Média	Desvpad	Média	Desvpad			p-value 0,05 (*)	p-value 0,05 (*)
Ac Gordos	0,24	0,05	0,35	0,12				0,33	0,23	0,34	0,04					
14:0					↑							↑				
16:0	19,63	0,40	19,65	0,96	↑			20,66	1,14	19,83	0,76	↓				
18:0	16,85	1,53	16,27	1,13	↓			16,71	2,75	17,06	1,40	↑				
Outros Saturados	0,33	0,03	0,30	0,02	↓			0,29	0,01	0,29	0,03	(=)				
Total Saturados	37,04	1,56	36,56	0,73	↓			37,99	1,44	37,53	0,77	↓			*	
16:1	1,95	0,65	2,77	1,21	↑			2,36	1,04	2,70	0,62	↑				
18:1n-9	5,74	0,81	6,19	0,96	↑			6,39	2,22	5,70	0,50	↓				
18:1n-7	3,51	1,13	4,53	0,66	↑			3,57	0,42	4,18	0,93	↑				
Out MUFA	0,23	0,03	0,39	0,20	↑			0,27	0,14	0,38	0,04	↑				
Total MUFA	11,42	2,22	13,87	2,67	↑			12,59	3,61	12,96	1,86	↑				
18:2n-6	17,53	0,51	16,02	1,35	↓			16,36	1,76	16,14	0,93	↓				
18:3n-3	0,24	0,04	0,16	0,13	↓			0,24	0,19	0,23	0,02	↓				
20:4n-6 (AA)	22,69	0,96	20,54	1,86	↓			21,46	3,04	18,66	0,71	↓			*	
20:5n-3 (EPA)	0,60	0,14	0,93	0,14	↑		*	0,80	0,06	2,11	0,19	↑		*	*	
22:5n-3 (DPA)	1,02	0,17	1,17	0,28	↑			1,16	0,19	2,05	0,25	↑		*	*	
22:6n-3 (DHA)	6,71	0,57	6,65	0,89	↓			6,21	1,06	6,44	0,42	↑				
Out PUFA	1,40	0,09	1,32	0,42	↓			1,49	0,32	1,62	0,11	↑				
Total PUFA	49,95	1,13	46,64	2,70	↓			47,48	2,48	47,02	1,27	↓				
Σn-3	8,96	0,80	9,39	1,11	↑			8,77	1,12	11,24	0,51	↑		*	*	
Σn-6	40,70	1,00	36,97	2,93	↓		*	38,46	1,49	35,46	1,42	↓		*	*	
Σn-3/Σn-6	0,22	0,02	0,26	0,04	↑			0,23	0,02	0,32	0,02	↑		*	*	

Tabela 2- Valores de média e desvio padrão para os respectivos ácidos gordos nos respectivos grupos em diferentes fases do estudo no fígado. (*- existência de diferenças significativas com $p\text{-value}<0,05$; ↑- aumento; ↓- decréscimo; (=)- mantido)

RIM	Controlo (Ctrl)						Microalga (Micro)						Ctrl vs Micro (15 dias)		Ctrl vs Micro (2meses)	
	15 Dias		2 meses		Comparação (ctrl/15 dias vs ctrl 2meses)		Análise estatística (15dias ctrl vs 2meses ctrl)		15 Dias		2 meses		Comparação (micro/15 dias vs micro 2meses)		Análise estatística (15dias micro vs 2meses micro)	
	Média	Desvpad	Média	Desvpad			p-value 0,05 (*)		Média	Desvpad	Média	Desvpad			p-value 0,05 (*)	p-value 0,05 (*)
14:0	1,81	0,05	1,89	0,20	↑			1,71	0,11	2,18	0,26	↑			*	
16:0	27,45	1,09	27,68	1,36	↑			26,09	1,19	28,91	1,51	↑		*		
18:0	8,03	0,69	7,76	1,02	↓			7,90	1,20	7,23	0,56	↓				
Outros SAF	1,06	0,10	1,08	0,16	↑			0,91	0,12	1,08	0,11	↑		*		(=)
Total SAF	38,35	0,43	30,64	1,50	↓		*	36,61	0,20	32,16	1,86	↓		*		↑
16:1	8,21	0,82	8,81	1,10	↑			7,39	0,96	9,27	0,97	↑		*		↑
18:1n-9	21,23	1,77	22,92	2,12	↑			21,76	2,37	21,72	1,16	↓				↓
18:1n-7	3,30	0,13	3,62	0,29	↑			3,31	0,17	3,42	0,26	↑				↓
Outros MUFA	0,42	0,06	0,44	0,13	↑			0,44	0,08	0,43	0,09	↓				↓
Total MUFA	33,19	2,05	35,79	2,85	↑			32,90	2,11	34,83	1,66	↑				↓
18:2n-6	15,72	0,83	14,76	2,54	↓			17,36	1,70	15,20	1,88	↓				↑
18:3n-3	0,71	0,10	0,60	0,09	↓			0,76	0,21	0,70	0,13	↓				↑
20:4n-6 (AA)	8,80	1,48	6,95	1,86	↓			8,90	1,35	6,23	0,76	↓				↓
20:5n-3 (EPA)	0,07	0,08	0,12	0,07	↑			0,16	0,02	0,19	0,16	↑				↑
22:5n-3 (DPA)	0,04	0,07	0,26	0,08	↑		*	0,10	0,12	0,26	0,08	↑				(=)
22:6n-3 (DHA)	0,78	0,13	0,68	0,20	↑			0,78	0,09	0,70	0,11	↓				↑
Outros PUFA	1,59	0,05	1,45	0,06	↓		*	1,69	0,13	1,56	0,27	↓				↑
Total PUFA	26,96	2,27	31,47	3,50	↑			28,44	1,65	31,06	1,94	↑				↓
Σn-3	2,08	0,21	1,82	0,26	↓			2,27	0,17	2,02	0,35	↓				↑
Σn-6	24,66	2,08	21,83	2,77	↓			25,94	1,49	21,53	1,90	↓		*		↓
Σn-3/Σn-6	0,08	0,00	0,08	0,01	(=)			0,09	0,00	0,09	0,01	(=)				↑

Tabela 4- Valores de média e desvio padrão para os respectivos ácidos gordos nos diferentes grupos em diferentes fases do estudo no coração. (*- existência de diferenças significativas com $p\text{-value}<0,05$; ↑-aumento;↓- decréscimo; (=)-mantido)

	Controlo (Ctrl)						Microalga (Micro)						Análise estatística (ctrl vs micro) (2meses)	Análise estatística (ctrl vs micro) (15 dias)	Comparação (ctrl vs micro) (2meses)		
	15 Dias		2 meses		Comparação (ctrl vs micro) (15 dias vs 2meses)		15 Dias		2 meses		Comparação (micro vs micro) (15 dias vs 2meses)						
	Média	Desvpad	Média	Desvpad	p-value 0,05 (*)	Média	Desvpad	Média	Desvpad	Média	Desvpad	p-value 0,05 (*)				p-value 0,05 (*)	
GORDURA VISCERAL																	
Ácidos Gordos																	
14:0	2,05	0,11	2,23	0,10	↑	*	2,12	0,14	2,38	0,12	↑	*					↑
16:0	28,93	0,41	29,87	0,95	↓		28,85	0,69	30,83	2,26	↑						↑
18:0	2,94	0,10	2,31	0,65	↓		3,09	0,42	2,75	0,39	↓						↑
Outros SAF	0,35	0,03	0,54	0,13	↑	*	0,35	0,04	0,59	0,10	↑	*					↑
Total SAF	34,27	0,58	32,64	1,02	↓	*	34,40	0,76	33,80	2,30	↓						↑
16:1	8,58	0,49	10,03	2,01	↑		8,0	0,56	9,55	1,50	↑						↓
18:1	26,93	1,19	27,72	1,88	↑		26,7	2,1	26,01	1,70	↓						↓
Outros MUFA	1,06	0,19	0,80	0,12	↓	*	1,17	0,07	0,87	0,15	↓						↑
Total MUFA	36,57	1,49	36,55	3,90	↑		35,84	1,84	36,42	2,62	↑	*		*			↓
18:2n-6	24,71	1,48	21,93	3,36	↓		25,66	1,43	22,31	1,68	↓	*					↑
18:3n-3	1,57	0,18	1,25	0,11	↓		1,58	0,15	1,34	0,13	↓	*					↑
20:4n-6 (AA)	0,39	0,02	0,59	0,75	↑	*	0,38	0,08	0,56	0,57	↑						↑
20:5n-3 (EPA)	0,03	0,04	0,04	0,03	↑		0,05	0,05	0,22	0,07	↑	*		*			↑
22:5n-3 (DPA)	0,10	0,09	0,05	0,08	↑		0,08	0,10	0,14	0,10	↑						↑
22:6n-3 (DHA)	0,20	0,19	0,22	0,14	↑		0,21	0,15	0,35	0,29	↑						↑
Outros PUFA	1,28	1,82	1,72	0,93	↑		1,25	0,23	1,63	0,83	↑						↓
Total PUFA	27,79	1,82	25,36	4,20	↓		28,74	1,95	25,85	1,79	↓	*					↑
Σn-3	2,03	0,40	1,87	0,50	↓		2,1	0,40	2,05	0,41	↓						↑
Σn-6	25,41	1,51	22,99	3,88	↓		26,34	1,56	23,35	1,74	↓	*					↑
Σn-3/Σn-6	0,08	0,01	0,08	0,02	(=)		0,08	0,01	0,09	0,02	↓						↑

Tabela 6- Valores de média e desvio padrão para os respectivos ácidos gordos nos diferentes grupos em diferentes fases do estudo na gordura visceral. (*- existência de diferenças significativas com $p\text{-value}<0,05$; ↑-aumento; ↓-decréscimo; (=)- mantido)

DIAS	ASTAXANTINA				LUTEINA				ZEAXANTINA				β-CAROTENO			
	MÉDIA (µg/mL)	D.P.	MÉDIA % (m/m)	D.P.	MÉDIA (µg/mL)	D.P.	MÉDIA % (m/m)	D.P.	MÉDIA (µg/mL)	D.P.	MÉDIA % (m/m)	D.P.	MÉDIA (µg/mL)	D.P.	MÉDIA % (m/m)	D.P.
1	77,3	8,8	3,0E-02	1,1E-02	0,74	0,30	2,8E-04	1,1E-04	0,92	0,44	3,3E-04	1,7E-04	74,93	24,80	2,9E-02	1,0E-02
2	62,6	28,0	2,4E-02	1,4E-02	0,68	0,42	2,6E-04	1,7E-04	0,82	0,57	3,2E-04	2,2E-04	65,95	10,94	2,6E-02	1,8E-02
3	41,5	22,2	2,6E-02	1,0E-02	0,34	0,16	2,2E-04	1,6E-04	0,42	0,23	2,8E-04	3,2E-05	20,15	3,02	1,3E-02	1,0E-02
4	42,2	5,9	1,6E-02	2,0E-03	0,55	0,12	2,0E-04	3,9E-05	0,73	0,19	2,7E-04	6,3E-05	46,38	12,12	1,7E-02	4,2E-03
5	51,8	19,6	2,0E-02	7,3E-03	0,54	0,27	2,1E-04	1,0E-04	0,52	0,22	2,0E-04	8,3E-05	55,72	30,96	2,1E-02	1,6E-02
9	188,3	20,3	7,3E-02	9,4E-03	1,92	0,50	3,0E-04	1,3E-04	2,44	0,72	3,8E-04	1,3E-04	100,64	8,33	1,3E-02	2,1E-03
10	118,7	15,7	4,3E-02	8,9E-03	1,75	0,77	6,3E-04	2,8E-04	2,32	1,16	8,5E-04	4,3E-04	111,05	23,04	4,1E-02	1,4E-02
11	175,0	6,1	6,6E-02	8,1E-04	1,65	0,76	6,2E-04	2,9E-04	1,99	0,97	7,3E-04	3,6E-04	142,26	4,62	5,4E-02	2,8E-03
14	230,8	2,8	9,1E-02	1,2E-03	2,21	0,89	8,6E-04	2,6E-04	2,87	1,40	1,1E-03	5,3E-04	95,45	12,65	5,0E-02	1,2E-02
15	96,2	9,4	3,7E-02	2,2E-03	1,41	0,30	5,3E-04	9,6E-05	1,73	0,46	6,3E-04	1,3E-04	66,85	7,06	2,3E-02	6,2E-03
16	143,3	20,4	5,4E-02	8,2E-03	1,45	0,47	5,3E-04	1,8E-04	1,92	0,60	7,3E-04	2,3E-04	80,23	10,03	3,1E-02	4,0E-03
17	178,1	19,4	7,0E-02	9,6E-03	0,82	0,38	4,3E-04	1,0E-04	1,17	0,83	6,1E-04	1,4E-04	94,29	18,13	3,4E-02	1,2E-02
18	30,4	3,2	1,2E-02	1,1E-03	1,18	0,43	4,6E-04	1,7E-04	1,55	0,52	6,0E-04	2,1E-04	58,49	4,99	2,2E-02	2,2E-03

Tabela 7- Valores de média e desvio padrão para a concentração em µg/mL e em percentagem massa/massa da excreção diária de astaxantina, luteína, zeaxantina e β-caroteno. (D.P.- desvio padrão)