UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

Avaliação físico-química de óleos da amêndoa de pequi (*Caryocar brasiliense*Camb.) obtidos artesanalmente e por prensagem a frio e sua influência sobre

marcadores bioquímicos, oxidativos e inflamatórios de ratos submetidos à toxicidade

aguda por tetracloreto de carbono

Lucillia Rabelo de Oliveira Torres

Tese para obtenção do grau de DOUTOR Orientador:

Prof. Tit. Jorge Mancini Filho

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Bromatologia

Avaliação físico-química de óleos da amêndoa de pequi (*Caryocar brasiliense*Camb.) obtidos artesanalmente e por prensagem a frio e sua influência sobre

marcadores bioquímicos, oxidativos e inflamatórios de ratos submetidos à toxicidade

aguda por tetracloreto de carbono

Lucillia Rabelo de Oliveira Torres

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018. O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Tese para obtenção do grau de DOUTOR Orientador:

Prof. Tit. Jorge Mancini Filho

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Torres, Lucillia Rabelo de Oliveira

T693a Avaliação físico-química de óleos da amêndoa de pequi (Caryocar brasiliense Camb.) obtidos artesanalmente e por prensagem a frio e sua influência sobre marcadores bioquímicos, oxidativos e inflamatórios de ratos submetidos à toxicidade aguda por tetracloreto de carbono / Lucillia Rabelo de Oliveira Torres.

- São Paulo, 2016.

94p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

Orientador: Mancini Filho, Jorge

1. Antioxidantes : Ciências dos alimentos 2. Lipídeos I. T. II. Mancini Filho, Jorge, orientador.

641.19 CDD

Lucillia Rabelo de Oliveira Torres

Avaliação físico-química de óleos da amêndoa de pequi (*Caryocar brasiliense*Camb.) obtidos artesanalmente e por prensagem a frio e sua influência sobre

marcadores bioquímicos, oxidativos e inflamatórios de ratos submetidos à toxicidade

aguda por tetracloreto de carbono

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Pro	of. Dr. Jorge Mancii	ni Filho		
Orientador/presidente				
	1o. examinado	г		
	2o. examinado	r		
	3o. examinador	r		
	4o. examinado	r		
São Paulo.	de	de 2016.		

Ao meu marido Leonardo pelo amor e pelo exemplo.

AGRADECIMENTOS

Nada na vida conquistamos sozinhos. Muitas vezes, um simples gesto pode nos conduzir para o caminho do sucesso. Os resultados de um trabalho de pesquisa como esse só logram êxito com a cooperação e o esforço de outras pessoas e é um prazer genuíno poder agradecê-las. Antes de mais nada, sou grata a Deus pelas bênçãos diárias e por me dar forças para persistir mesmo com as dificuldades. O Professor Jorge Mancini Filho me orientou, ensinou gentilmente e me motivou, acreditando sempre no nosso trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) apoiaram financeiramente minha pesquisa e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Cerrados, na pessoa do Dr. Herbert Lima, me forneceu as amostras de óleos.

De modo mais imediato, agradeço aos amigos do Laboratório de Lípides pelo apoio intelectual e profissional maravilhoso durante longo período, em especial à Rosângela Pavan, por sempre estar a postos a qualquer necessidade. Eliane Bonifácio, Claudimar de Jesus, Guto Satler, pela ajuda e boa convivência. Illana Melo e Luciana Tedesco tiveram interesse especial em me ajudar generosamente quando mais precisei e me fizeram acreditar no meu trabalho. As Fernandas, Santana e Shinagawa, me deram além do que alguém poderia desejar de amigos: ajuda profissional, intelectual e uma bela amizade com direito a risadas diárias. Serei eternamente grata pelo suporte dado em todos os momentos!

O Instituto Federal de Educação Tecnológica do Maranhão (IFMA) me permitiu afastar das atividades docentes para concluir o doutorado. Sou grata em especial ao Diretor Geral do Câmpus Caxias, Dr. João da Paixão, e ao Guilherme Andrade, Daniel Evangelista, Luiz Fernando Maia, Rodrigo Calvet, Ana Júlia Rêgo e Josiane Oliveira pelo apoio e aos meus alunos do curso de Agroindústria por serem minha motivação.

Minha família, sempre me incentivou com amor. Obrigada aos meus irmãos Douglas e Renato Rabelo; meus avós Lucília Ferreira e Raimundo Alexandrino, pelas orações e alicerce; meus pais, José Ferreira e Creusa Rabelo, que, apesar de todas as dificuldades, se doam em tudo o que fazem pelo bem dos filhos. Obrigada

por terem me segurado quando pensei em desistir. Qualquer palavra, qualquer exemplo, não serão suficientes para demonstrar o meu mais precioso agradecimento.

O meu amado marido, Leonardo Torres Leal, é o meu grande exemplo de pesquisador e de ser humano a quem muito admiro. Ele me faz persistir, é o meu maior incentivador e, por causa dele, também concluí essa etapa. A ele eu dedico, com amor, esse trabalho.

Agradeço particularmente o encorajamento dado pelos professores Eduardo Purgatto e Suzana Lannes, o apoio dos professores Tânia Marcourakis, Lígia Bicudo, João Roberto e João Paulo, bem como os conselhos dos professores Alexis Vidal e Bruno Cogliatti, o qual, juntamente com Cíntia, me ajudou com as análises histológicas. Os professores Jivaldo Matos e Gabriel Araújo e a aluna Roxana Flores me fizeram adquirir apurados conhecimentos na disciplina de Análise térmica e a Verônica Carranza e o técnico Paulo Jr. me ajudaram preciosamente com tais análises.

André Bessa e Fernando Silveira, do Instituto de Psicologia, me fizeram enxergar outras maneiras de pensar que me deram mais leveza e contribuíram para o meu amadurecimento pessoal e profissional. Os professores das bancas de ingresso e de qualificação do doutorado, Inar Alves, Tânia Marcourakis, Úrsula Marquez, Luiz Antonio Gioelli, Nágila Damasceno e Suzana Lannes, também contribuíram para esse crescimento.

Ao longo de todo o trajeto, os técnicos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental sempre ofereceram a sua *expertise*. Sou grata a Alexandre Pimentel, Ivanir Pires, Renato Heidor, em especial, a Luciene Lauer e ao amigo Elias Araújo, pela generosidade com que me assistiram. Sem vocês, teria sido muito mais difícil! Obrigada! Emídio Matos, Joana Carola, Raquel Galvão, Rodolfo Camargo, Bruna Zavarize e Graziela Biude me assistiram na análise de PCR prontamente. Por isso, agradeço a eles e as professoras Marília Seelaender e Sílvia Cozzolino, pela ajuda inestimável. Os amigos John Harris e Jorge de Lima gentilmente me auxiliaram com as línguas inglesa e portuguesa, respectivamente.

Pessoalmente, eu tenho prazer particular em agradecer aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Mônica Perussi, Cleonice Estrela, Roberta

Uehara, Irineu Oliveira, D. Francisca, D. Cida e, em especial, Lurdinha Pedroza, Edilson Feitosa, João Félix e Elaine Ychico, por terem me acolhido com carinho, bem como os funcionários do Biotério Fátima, Renata, José e Flávia, que me auxiliaram sempre. Katia Kalou, Kaluce Almondes, Luciane Alencar, Janaína Donadio, Ariana Rocha, Leila Hashimoto e Verônica, do Laboratório de Nutrição e Minerais; Roberto e Fábia, do Laboratório de Dieta Nutrição e Câncer; Daiana Viana, Gabriela Teodoro e Luciana Nishimura, do Laboratório de Nutrição e Esporte; Ana Lina, Amanda e Vivianne Rocha, do Laboratório de Nutrição e Ferro; Thiago e Vanessa da UFS, Victor Castro e professora Graça Citó, da UFPI, me ajudaram de muitas formas. A Isabel Massaretto e a Bruna Lima me ajudaram com carinho e atenção em momentos complicados.

Sinto uma imensa felicidade por todas as alegrias, abraços e vida compartilhada junto das irmãnzinhas Liliane Pires e Ana Mara Silva durante a estadia em São Paulo. Agradeço a Ana Mara também pela ajuda intelectual, a Michelle Garcez, Raquel Galvão e Athayde Neto pelos sinceros e agradávéis dias de companheirismo e a Fernanda Matos e Tancredo Neto pelo conforto da estadia em São Paulo. O laço criado com Dona Nair, Maynara, Tiago Eugênio, Patrícia, Amanda, Ciro, Talita, Betinho, Samira, Grazie, Cíntia, Manuela, Domynick, Andréia, George e, em especial, Alexandra Melo, Milessa Afonso e Lidiane Correia me deixam extremamente grata.

Por fim, mas certamente com a mesma importância, os amigos do Piauí Cecília Teresa, Josyanne Neves, Reijane Lima, Alyne Carla, Cristiane Andrade, Simone Lima, Fabrina Almeida, Ivone Ribeiro, Karla Freitas, Larice Lopes, Teresinha Veloso e Talita Araújo sempre me apoiaram e me deram força para continuar, direta ou indiretamente. Agradeço ainda a família Torres Leal, pelo apoio e pela confiança, e ao Tio Alípio (*in memoriam*) pelas palavras de incentivo e coragem, muita coragem!

"Em todas estas coisas, porém, somos mais que vencedores, por meio daquele que nos amou". Rm 8:37.

RESUMO

TORRES, L. R. O. Avaliação físico-química de óleos da amêndoa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) obtidos artesanalmente e por prensagem a frio e sua influência sobre marcadores bioquímicos, oxidativos e inflamatórios de ratos submetidos à toxicidade aguda por tetracloreto de carbono. 2016. 94p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O óleo da amêndoa de pequi (Caryocar brasiliense Camb.) é considerado um coproduto do fruto, consumido na região do Cerrado, bioma brasileiro. Ele é fundamental para agregar valor e ampliar a utilização deste fruto regional a outros setores produtivos comerciais. Relatos na literatura apontam que o óleo possui capacidade antioxidante e efeitos benéficos sobre doenças inflamatórias, que estão associados à presença de ácidos graxos insaturados e fitoquímicos em sua composição química. Por outro lado, o tetracloreto de carbono (CCl₄) é uma potente hepatotoxina, capaz de gerar radicais livres que levam ao estresse oxidativo e à inflamação. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar os óleos da amêndoa de pequi obtidos artesanalmente e por prensagem a frio e verificar o efeito de seus constituintes graxos e bioativos sobre parâmetros oxidativos e inflamatórios de ratos submetidos à toxicidade aguda induzida por tetracloreto de carbono. Inicialmente, foram investigados os parâmetros de qualidade dos óleos, bem como o perfil de ácidos graxos, teores de compostos bioativos, capacidade antioxidante e estabilidade termo-oxidativa. Os óleos da amêndoa de pequi apresentaram boa qualidade e resistência termo-oxidativa e mostraram-se ricos em ácido graxo oleico, além de possuírem compostos com propriedades antioxidantes, como fenólicos, carotenoides, tocoferóis e fitosteróis. Posteriormente, o efeito do tratamento por 22 dias com óleos da amêndoa de pequi artesanal ou prensado a frio (3 mL/kg) sobre a toxicidade aguda induzida pelo CCl₄ em ratos "Wistar" machos foi avaliado. Para tal, foram determinados marcadores bioquímicos séricos, perfil lipídico, peroxidação lipídica, marcadores do sistema de defesa antioxidante e detoxificante, além de parâmetros inflamatórios do tecido hepático. De maneira geral, verificou-se que os óleos da amêndoa de pequi não minimizaram as alterações hepáticas induzidas pelo CCI4, evidenciadas pelas enzimas marcadoras do dano hepático e por parâmetros inflamatórios, no entanto os animais tratados com o óleo prensado a frio aumentaram sua capacidade antioxidante.

Palavras-chave: Amêndoa de pequi. Ácidos graxos. Antioxidantes. Estresse oxidativo. Inflamação. Hepatoproteção.

ABSTRACT

TORRES, L. R. O. Evaluation of physical-chemistry properties of handmade and cold-pressed pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil and its influence on biochemical, oxidative and inflammatory markers in rats subjected to carbon tetrachloride-induced acute toxicity. 2016. 94p. Thesis (Doctorate) – Faculty of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, São Paulo, 2016.

The pegui (Caryocar brasiliense Camb.) almond oil is considered a by-product of the fruit, consumed in the Brazilian savannah region. It is essential to add value and increase the use this regional fruit to other commercial productive sectors. The pequi almond oil has been reported to possess antioxidant capacity and beneficial effect on inflammatory diseases due its chemical composition in unsaturated fatty compounds and phytochemicals. On the other hand, the carbon tetrachloride (CCl₄) is a potent hepatotoxin that is capable of generating free radicals and lead to oxidative stress and inflammation. In this context, the aim of this study was to characterize the pequi almond oils obtained by handmade and cold-press process and verify the effect of their fatty acids and bioactive constituents on oxidative and inflammatory parameters in rats submitted to carbon tetrachloride-induced acute toxicity. Initially, quality parameters, chemical composition and thermo-oxidative stability of the oils were investigated. The pequi almond oils showed good quality and thermo-oxidative resistance and shown to be rich in oleic fatty acid, besides the presence of compounds with antioxidant properties, such as phenolics, carotenoids, tocopherols and phytosterols. Subsequently, the effect of the oils (3 mL/kg) treatment for 22 days on acute toxicity induced by CCl4 in male Wistar rats was evaluated. The serum biochemical markers levels, lipid profile, lipid peroxidation, markers of antioxidant defense and detoxication and inflammatory parameters in liver tissue were determined. In general, it was found that the pequi almond oil not minimized liver alterations induced by CCl₄, as evidenced by the liver function enzymes and the inflammatory parameters, however in animals which received the cold pressed oil was increased antioxidant capacity.

Keywords: Pequi almond. Fatty acids. Antioxidants. Oxidative stress. Inflammation. Hepatoprotection.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA Ácido araquidônico

ABTS 2,2' azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico

AG Ácidos graxos

AGI Ácidos graxos insaturados AGMI Ácidos graxos monoinsaturados AGPI Ácidos graxos poli-insaturados

FAL Fosfatase alcalina

ALT Alanina aminotransferase ANOVA Análise de variância

AOAC Association of official analytical chemists

AOCS American Oil Chemists' Society

APPH 2,2'-azobis (2-amidinopropano) di-hidrocloreto

AST Aspartato amino transferase

BF₃ Trifluoreto de boro

CAT Catalase CCl₃• Triclorometil

CCl₃OO* Triclorometil peroxil CCl₄ Tetracloreto de carbono

cDNA Ácido desoxirribonucleico complementar CEUA Comissão de Ética em Uso Animais

CG Cromatografia gasosa

CONCEA Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

Ct Cycle Threshold
CT Colesterol total

CYP2E1 Citocromo P-450, subunidade 2E1

CYP450 Citocromo P450

DPPH* Radical 2,2-difenil 1-picril-hidrazil
DSC Calorimetria exploratória diferencial

DTA Análise térmica diferencial

DTG Primeira derivada termogravimétrica
DTNB 5,5 ditiobis-2,2 ácido nitrobenzóico
EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ERO Espécies reativas de oxigênio

F Fator de correção

FCF Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FT Fenólicos totais

g Grama

GAE Equivalente de ácido gálico
GPX Glutationa peroxidase
GR Glutationa redutase
GSH Glutationa reduzida
GSSG Glutationa oxidada

GST Glutationa-S-transferase

h Hora

HCI Ácido clorídrico

HDL Lipoproteína de alta densidade

HPLC High performance liquide chromatography
HPRT1 Hipoxantina fosforribosil-transferase 1

HSD Honest Significant Difference

H₂O₂ Peróxido de hidrogênio

IC₅₀ Capacidade de inibição de 50% do radical

IKKα IkappaB quinase-alfa IKKβ IkappaB kinase-beta

IL Interleucina

IQ Instituto de Química

kg Quilogramas

KOH Hidróxido de potássio

L Litros

LDL Lipoproteína de baixa densidade

LOX Lipoxigenase
LPS Lipopolissacarídeo
LTB-4 Leucotrieno-4
LTB-5 Leucotrieno-5

MCP1 Proteína quimiotática de monócitos 1

MDA Malonaldeído Miliequivalente mEq Miligramas mg Metros m M Molar Minuto min mL Mililitros mm Milímetros mM Milimolar

n Número de repetições

N₂ Nitrogênio

NADPH Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

Na₂SO₄ Sulfato de sódio

n-9 Ômega 9

NaCl Cloreto de sódio

NF-κβ Fator nuclear kappa beta

ng Nanogramas nm Nanômetros nMol Nanomolar NO Óxido nítrico O2 Gás oxigênio

OAP Óleo da amêndoa de pequi

ORAC Capacidade de absorbância do radical oxigênio

p Valor de probabilidade (p-valor)

PAA Óleo da amêndoa de pequi artesanal
PAP Óleo da amêndoa de pequi prensados a frio

PCR Polymerase chain reaction

PGE2 Prostaglandina E2

pH Potencial hidrogeniônico

PPARy Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma-gama

PTFE Politetrafluoretileno

qPCR Real-time polymerase chain reaction

qRT-PCR Real-time reverse transcription polymerase chain reaction

RIPA Radio-immunoprecipitation assay

RL Radical livre RNA Ácido ribonucleico rpm Rotacões por minuto

RPS13 Proteína ribossomal 40S S13 SDS Dodecil sulfato de sódio SOD Superóxido dismutase

T_o Início extrapolado da oxidação

TAG Triacilgliceróis

TBA Teste do ácido tiobarbitúrico

TE Equivalente de trolox

TEAC Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox®

TEP 1,1',3,3'-tetraetoxipropano

Tf Temperatura final

TG Curva termogravimétrica

TGF-β Fator de transformação do crescimento-beta

TGFR-1 Receptor do fator de transformação do crescimento beta 1 TGFR-2 Receptor do fator de transformação do crescimento beta 2

Ti Temperatura inicial

TLR2 Receptores do tipo Toll 2
TLR4 Receptores do tipo Toll 4
TNF-α Fator de necrose tumoral-alfa

TNFR Receptor do fator de necrose tumoral

ton Toneladas

T_p Temperatura de ocorrência máxima do evento

U Unidade

USDA Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

USP Universidade de São Paulo

UV Ultravioleta V Volume

v/v Volume/volume
% Porcentagem
°C Graus Celcius
® Marca registrada

α Alfa β Beta κ Kappa γ Gama δ Delta

μg Micrograma μL Microlitro μm Micrômetro μM Micromolar μmol Micromoles

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 CAPÍTULOS	19
2.1 Capítulo 1 – Propriedades físico-químicas e antioxidantes do óleo da amêndoa de pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.) obtido artesanalmente ou por prensagem a frio	20
2.2 Capítulo 2 – Efeito do óleo da amêndoa de pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.) sobre a injúria hepática aguda induzida pelo tetracloreto de carbono em ratos	47
3 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	78
ANEXOS	81
ANEXO A – Carta de aceite do artigo	81
ANEXO B – Cromatogramas correspondentes ao perfil de ácidos graxos dos óleos da amêndoa de pequi obtidos artesanalmente (a) (amostra PAA30) ou (b) por prensagem a frio (amostra PAP31)	82
ANEXO C – Cromatogramas correspondentes ao perfil de fitosteróis dos óleos da amêndoa de pequi obtidos artesanalmente (a) (amostra PAA30) ou (b) por prensagem a frio (amostra PAP31)	83
ANEXO D – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais	84
ANEXO E – Ração comercial utilizada para animais no experimento biológico	85
ANEXO F – Ganho de peso corpóreo total, Consumo de ração, Coeficiente de eficácia alimentar (CEA) e Consumo calórico total de ratos induzidos com tetracloreto de carbono	86
ANEXO G – Cromatograma referente ao padrão e malonaldeído (MDA) hepático de um animal	87
ANEXO H – Ficha do aluno	88
ANEXO I – Currículo Lattes	91

1 INTRODUÇÃO

O pequi é um fruto rico em óleo encontrado no Cerrado brasileiro. Seu uso pode oferecer novas perspectivas para o desenvolvimento sustentável da região, por possuir composição útil para consumo humano, rica em ácidos graxos (AG) e al.. 2007: VERA compostos bioativos (GARCIA et et al.. 2007: ROESLER et al., 2008). A amêndoa do pequi é um subproduto pouco explorado, devido a maior parte da utilização do fruto ser voltada para a polpa (RABÊLO et al., 2008). No entanto, quando empregado na culinária, seu uso é mais comumente voltado para a fabricação de pamonha, bolo, paçoca, como condimento, para consumo in natura (OLIVEIRA, 2009) ou, ainda, para torrefação e consequente produção de óleo (POZO, 1997) - o qual é utilizado também para fins medicinais (SILVA et al., 2012; MATOS, 2007).

O óleo da amêndoa de pequi possui perfil de AG característico, que inclui altas porcentagens dos ácidos oleico (43-56 %) e palmítico (32-43 %) (MARIANO; COURI; FREITAS, 2009; LIMA, 2008). O oleico, um ácido graxo monoinsaturados (AGMI), é reconhecido por suas propriedades benéficas em modular o metabolismo lipídico, sendo considerado hipocolesterolêmico e contribuindo diretamente para o perfil de AG dos fosfolipídeos da membrana celular. Ele afeta numerosas atividades enzimáticas de transporte e receptores e tem sido associado à melhora na sensibilidade à insulina e à maior resistência às modificações oxidativas (VASSILIOU et al., 2009; CHONG; SINCLAIR; GUYMER, 2006). A composição química rica em oleico torna o óleo extraído da amêndoa de pequi de elevada relevância.

Dados sobre os compostos bioativos, como carotenoides, fenólicos, tocoferóis e fitosteróis, presentes nos óleos da amêndoa de pequi ainda são escassos na literatura. A maioria dos estudos refere-se aos compostos presentes na polpa. No entanto, tais dados do óleo da amêndoa são importantes para a avaliação da sua composição, sua estabilidade e dos seus potenciais efeitos nutricionais e de saúde.

Além dos fatores ambientais e de origem da matriz, outro aspecto que pode influenciar a composição em bioativos dos óleos é o processo de extração, como o

refino, a prensagem a frio e a extração artesanal, pois tais processos influenciam a passagem de compostos minoritários da amêndoa para o óleo e, dependendo do tipo, os compostos migram em maior quantidade para o óleo extraído, o que confere também maior atividade antioxidante (DIMITRIOS, 2006; MARTINS, 2006).

Acredita-se que a prensagem a frio de óleos de sementes seja uma técnica capaz de reter maior quantidade de componentes de valor agregado benéficos que poderiam ser perdidos durante a extração (PARRY JR., 2006). Nesse sentido, essa técnica está se tornando um substituto interessante para as práticas convencionais de extração (RAMADAN et al., 2012), como a que envolve processamentos térmicos rústicos usando água a altas temperaturas para obtenção artesanal do óleo da amêndoa de pequi, a qual pode alterar a qualidade original do produto, no que diz respeito a algumas moléculas-chave – como a fração insaponificável e as vitaminas lipossolúveis (MARIANO, 2008). Existe, portanto, a necessidade da caracterização dos óleos da amêndoa de pequi obtidos a partir desses processos de extração distintos quanto aos constituintes bioativos e ao perfil de AG.

Somado a isso, são poucas as investigações no sentido de avaliar os efeitos do consumo dos óleos da amêndoa de pequi para a saúde. Ele tem sido usado na medicina popular como cicatrizante e anti-inflamatório e no tratamento de dores reumáticas e musculares (SILVA et al., 2012; MATOS, 2007; PASSOS et al., 2003). Além disso, pesquisa aponta para atuação do óleo da amêndoa na inflamação e cicatrização de lesões induzidas experimentalmente em camundongos (DE OLIVEIRA et al., 2010).

Lesões agudas no fígado causam o desenvolvimento de doença hepática, a qual progride para falência hepática terminal, sendo o fator de iniciação e uma via comum para muitas doenças do fígado, ameaçando seriamente a saúde humana (LIU et al., 2014). As lesões hepáticas agudas podem ser causadas por substâncias hepatotóxicas durante a sua biotransformação no fígado, sendo as mais frequentemente referidas o paracetamol, a tioacetamida, o tetracloreto de carbono (CCI₄) (RAMASAMY et al., 2014; BELANGER; BUTTERWORTH, 2005).

A hepatotoxicidade induzida pelo CCl₄ é um modelo experimental interessante para investigar danos agudos ou crônicos ao fígado. O metabolismo do CCl₄ se inicia no fígado com ação da enzima citocromo P-450, subunidade 2E1

(CYP2E1), que o transforma em radicais livres (RL) geradores de estresse oxidativo (WEBER; BOLL; STAMPFL, 2003). Os metabólitos tóxicos do CCl₄ podem também induzir as células de Kupffer a secretar citocinas inflamatórias – tais como interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), fator de transformação do crescimentobeta (TGF- β) –, a inibir o óxido nítrico (NO) e a induzir a inflamação e a fibrose hepáticas (WILLS; ASHA, 2012).

Os RL gerados pelo CCl₄, bem como por outras doenças e patologias hepáticas, podem ser eliminados através da ação de antioxidantes que impedem ou diminuem o dano hepático aumentando a atividade das enzimas antioxidantes intracelulares endógenas, incluindo superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPX), catalase (CAT) e glutationa redutase (GR) (RAMASAMY et al., 2014; HSU et al., 2009). Compostos, naturais ou sintéticos, com propriedades antioxidantes podem contribuir para a redução parcial ou total do dano, podendo ter papel significativo na manutenção da saúde, quando consumido como parte da dieta normal (LI et al., 2013).

Estudos têm demonstrado ainda que óleos ricos em AGMI e em ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) apresentam efeito protetor em ratos e camundongos submetidos à injúria pelo CCl₄, por elevar os níveis das enzimas antioxidantes endógenas (SOD, CAT e GPX) e reduzir a peroxidação lipídica. Adicionalmente, os compostos bioativos com propriedades antioxidantes presentes nos óleos auxiliam nessa proteção (JIA et al., 2011; HSU et al., 2009; MAHESWARI; RAO, 2005; WANASUNDARA; SHAHIDI; SHUKLA, 1997).

Nesse contexto, nossos objetivos foram direcionados no sentido de, inicialmente, avaliar físico-quimicamente os óleos da amêndoa de pequi obtidos artesanalmente e por prensagem a frio com relação aos parâmetros de qualidade, perfil lipídico, componentes bioativos, atividade antioxidante *in vitro* e estabilidades térmica e oxidativa, bem como comparar os dois tipos de óleo com relação a esses parâmetros. Além disso, levando-se em consideração que os ácidos graxos monoinsaturados presentes no óleo da amêndoa de pequi são incorporados nos tecidos de ratos, e que estes, juntamente com os compostos minoritários, podem melhorar os parâmetros lipídicos, oxidativos e inflamatórios, buscou-se analisar os efeitos da suplementação com óleo da amêndoa de pequi sobre esses parâmetros no

fígado de animais submetidos à toxicidade aguda induzida pelo tetracloreto de carbono.

2 CAPÍTULOS

O presente trabalho está apresentado em dois capítulos, os quais correspondem aos manuscritos desenvolvidos como parte dos resultados obtidos na pesquisa e a serem publicados em revistas científicas, conforme a seguir:

- Capítulo 1: Propriedades físico-químicas e antioxidantes do óleo da amêndoa de pequi (Caryocar brasiliense Camb.) obtido artesanalmente ou por prensagem a frio (Physicochemical and antioxidant properties of the pequi (Caryocar brasiliense Camb.) almond oil obtained by handmade and cold-pressed processes). Esse artigo foi aceito para publicação na revista International Food Research Journal (ANEXO A).
- Capítulo 2: Efeito do óleo da amêndoa de pequi (Caryocar brasiliense Camb.) sobre a injúria hepática aguda induzida pelo tetracloreto de carbono em ratos (Pequi (Caryocar brasiliense Camb.) almond oil effect on carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats). Esse artigo foi submetido para a revista Food and Chemical Toxicology.

2.1 Capítulo 1 – Propriedades físico-químicas e antioxidantes do óleo da amêndoa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) obtido artesanalmente ou por prensagem a frio

^{1,2}*Torres, L. R. O., ¹Shinagawa, F. B., ¹Santana, F. C., ¹Araújo, E. S., ³Oropeza, M. V. C., ¹Macedo, L. F. L., ¹Almeida-Muradian, L. B., ⁴Lima, H. C. e ¹Mancini-Filho, J.

¹Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, Caxias, Maranhão, Brasil.

³Departamento de Engenharia Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

⁴Embrapa Cerrados, Distrito Federal, Brasil.

* Autor correspondente. Email: lucilliaro@usp.br, Tel: + 55-11-30913688.

Resumo

O objetivo desse estudo foi caracterizar físico-quimicamente e determinar a capacidade antioxidante dos óleos da amêndoa de pequi (OAP) extraídos artesanalmente ou por prensagem a frio. Ambos os óleos apresentaram boa qualidade, avaliada pelos índices de acidez, peróxido e teste do ácido tiobarbitúrico. O perfil de ácidos graxos mostrou presença significativa de ácidos graxos monoinsaturados, principalmente do ácido oleico (53,48-55,41 %); ácidos graxos saturados, tais como o ácido palmítico (33,30-35,89 %); e poli-insaturados, como o ácido linoleico (5,85-7,23 %). Os teores de fenólicos totais variaram de 87,56 a 392,00 mg equivalente de ácido gálico/100 g e os de carotenoides totais de 36,03 a 262,40 mg/100 g. Os resultados de tocoferóis e de fitosteróis indicaram a presença predominante de α-tocoferol (52 a 67 %) e de estigmasterol (63 a 68 %), respectivamente. A capacidade antioxidante do OAP oscilou de 58,48 mg/mL a 76,46 mg/mL (Capacidade de inibição de 50 % do radical - IC₅₀) pelo método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*); de 10,61 a 40,46 TE μmol/g pelo método 2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS*+), e de 113,93 a

280,85 μmol equivalente de Trolox® (TE)/100 g e de 164,49 a 277,86 μmol TE/100 g, pelo método de capacidade de absorção do radical oxigênio hidrofílico e lipofílico, respectivamente. Os óleos apresentaram boa estabilidade térmica e oxidativa pelos métodos Rancimat® (período de indução de 7,33 a 15,91 h), análise termogravimétrica (337-363 °C) e calorimetria diferencial de varredura (159-184 °C). Os resultados confirmam a presença de compostos que conferem capacidade antioxidante, estabilidade oxidativa e térmica ao OAP extraído artesanalmente ou por prensagem a frio, o que indica que estes óleos podem potencialmente ser utilizados para fins alimentares e não alimentares.

Palavras-chave: Óleos de pequi amêndoa, Comportamento térmico, Ácidos graxos, Capacidade antioxidante, Prensagem a frio.

Introdução

No Brasil, há abundante oferta de oleaginosas usadas na produção de óleos vegetais; no entanto, é ainda necessário maior aproveitamento de óleos de sementes alternativas provenientes de cada região brasileira. O pequi, juntamente com outras novas alternativas, como pinhão manso (Jatropha curcas), nabo (Raphanus sativus L.), buriti (Mauritia flexuosa), macaúba (Acrocomia aculeata) e grande variedade de oleaginosas, surgem como espécies ainda a serem exploradas (OLIVEIRA; RAMALHO, 2006). Dados sobre composição e propriedades físicoquímicas, além de capacidade antioxidante, para a maioria desses óleos vegetais alternativos ainda não foram relatados na literatura científica (RAMADAN et al., 2012).

O pequi é encontrado no cerrado brasileiro e pertence à família Caricaceae, gênero *Caryocar* (BERNARDES et al., 2008; VERA et al., 2007). O fruto do pequi possui uma camada de polpa amarelada que circunda uma fina camada de espinhos e, mais internamente, uma amêndoa branca que é rica em óleo (DE OLIVEIRA SOUSA et al., 2011). A amêndoa é considerada um subproduto comercial inexplorado, proveniente do processamento da polpa; no entanto, ela pode ser torrada para a produção de óleo, consumida fresca ou como condimento

usada como um ingrediente culinário em bolos, paçocas e pamonhas (DA SILVA RABÊLO et al., 2008; SEGALL et al., 2006).

O óleo da amêndoa de pequi é constituído principalmente por ácidos graxos (AG), tais como os ácidos oleico (50,2 %), palmítico (42,3 %), e esteárico (1,5 %), e menores quantidades de mirístico, palmitoleico, linoleico e linolênico (MATA et al., 2009). Essa composição em AG fornece importante valor nutricional ao óleo da amêndoa de pequi (OAP), devido o consumo de ácido oleico estar relacionado com decréscimo nos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e redução do risco de doença coronariana (RAMADAN et al., 2012).

Apesar da pouca caracterização em relação aos compostos minoritários, o OAP é considerado uma boa fonte de matéria-prima para a indústria cosmética e alimentar, devido à sua composição em AG. Na medicina popular, OAP é utilizado como agente anti-inflamatório, para curar feridas e para o tratamento de dores reumáticas e musculares (DE OLIVEIRA et al., 2010; PASSOS et al., 2003). Pesquisas recentes apontam para o papel do óleo na inflamação e no reparo tecidual de lesões induzidas experimentalmente (LEITE et al., 2009; DA SILVA QUIRINO et al., 2009).

A extração do OAP é atualmente realizada por uma técnica rústica, em pequena escala, utilizando água em altas temperaturas e caracterizada como um processo artesanal (AQUINO et al., 2009). No entanto, o OAP prensado a frio, que utiliza um processo tecnológico bem conhecido por preservar o nível de compostos bioativos detentores de propriedades antioxidantes (HOED, 2010), não é produzido e muito menos disponibilizado no mercado local – como acontece com outros óleos vegetais.

Uma vez que pouca atenção tem sido dada ao conhecimento das propriedades físico-químicas e antioxidantes do OAP, extraído artesanalmente e por prensagem a frio, o presente estudo tem como objetivo investigar aspectos relacionados à qualidade, à composição em AG, ao teor de compostos bioativos, à capacidade antioxidante e aos perfis térmico e oxidativo desses óleos.

Material e métodos

Amostras

As amostras de óleo extraído da amêndoa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) artesanalmente ou por prensagem a frio foram fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Cerrados, Brasília, Distrito Federal). Frutos maduros do pequi foram randomicamente coletados durante o período de safra (entre janeiro e abril) após caírem naturalmente das árvores na comunidade Água Boa 2, localizada na cidade de Rio Pardo de Minas (latitude 15° 33' 40.12" e longitude 42° 23' 35.16"), Minas Gerais, Brasil e as amêndoas foram coletadas após o processamento da polpa para obtenção do óleo da polpa por cozimento em água quente (FERREIRA et al., 2011). Os caroços (amêndoa e mesocarpo), considerados resíduos do processamento, foram desidratados (secagem ao sol), durante 3 a 5 dias e, em seguida, as amêndoas foram separadas.

O óleo da amêndoa de pequi artesanal foi obtido pelo Grupo Produtivo de Mulheres da Comunidade Vereda Funda, Rio Pardo de Minas, submetendo as amêndoas a aquecimento inicial em temperatura de 60-70°C por aproximadamente 45 min, seguido de etapa de trituração e cozimento com água em ebulição na proporção de 1:3 (massa:volume). O óleo sobrenadante resultante do processo de cozimento foi separado, filtrado e aquecido em panela até perder o restante da água e, depois, foi filtrado.

O óleo prensado a frio foi extraído em laboratório da EMBRAPA, utilizandose de prensa hidráulica (Marconi, MA-098, Piracicaba, Brasil), pressão de 9 ton por 1 h em temperatura ambiente.

Os dois óleos obtidos foram filtrados e armazenados em frascos de vidro âmbar em temperatura de 6 °C. Os óleos da amêndoa de pequi artesanais (PAA) e prensados a frio (PAP) foram classificados de acordo com a safra em PAA10 e PAP11 (safra 2009/2010), PAA20 e PAP21 (safra 2010/2011) e PAA30 e PAP31 (safra 2011/2012). As condições de tempo e temperatura durante o manuseio e processamento dos óleos não foram verificadas.

Caracterização físico-química e composição em ácidos graxos

Foram utilizados métodos oficiais e práticas recomendadas pela Sociedade Americana de Química de Óleos (AOCS) para determinar os índices de acidez (mg KOH/g de óleo) e de peróxido (miliequivalente - mEq O₂/kg de óleo), teste do ácido tiobarbitúrico (TBA) (ng/g) (métodos Ca 5A-40, Cd 8b-90 e 19-90 Cd, respectivamente) (AOCS, 2004) dos óleos da amêndoa de pequi.

A determinação da composição em AG por cromatografia gasosa (CG) foi realizada submetendo as amostras, inicialmente, à esterificação com trifluoreto de boro (BF₃) 14 %, de acordo com o método Ce 2-66 (AOCS, 2004), utilizando-se cromatógrafo a gás (Shimadzu, Plus GC 2012, Quioto, Japão), com *software GC solution* e detector de ionização de chama. As condições para a análise foram as seguintes: coluna cromatográfica de sílica fundida SP-2560 (biscianopropil polisiloxana) com dimensões de 100 m x 0,25 mm; programação de temperatura da coluna: isotérmico a 140°C/5 min, aquecimento a 4 °C/min até 240°C, permanecendo nesta temperatura por 30 min; temperaturas do vaporizador e do detector: 250°C e 260°C, respectivamente; gás de arraste: hélio (1 mL/min); razão de divisão da amostra no injetor: 1/100. A determinação dos picos cromatográficos foi realizada por comparação do tempo de retenção dos picos das amostras com uma mistura padrão de 37 ésteres metílicos de ácidos graxos (Sigma-Aldrich, Supelco® 37 component FAME Mix, St. Louis, Estados Unidos). Os resultados foram expressos como porcentagem de área para cada pico identificado.

Extração da fração polar dos óleos

A extração da fração polar dos óleos foi obtida de acordo com a metodologia descrita por Montedoro et al. (1992), a qual foi usada para quantificar os fenólicos totais e a capacidade antioxidante por capacidade de absorbância do radical oxigênio (ORAC) e 2,2' azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS*+).

Fenólicos e carotenoides totais

A determinação dos fenólicos totais (FT) presentes na fração polar dos óleos foi realizada colorimetricamente, de acordo com metodologia descrita por Swain e Hillis (1959), adaptada para microplaca. O conteúdo de FT das amostras foi

quantificado, utilizando-se de curva padrão de ácido gálico (1,56-100 mg/mL), e os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (GAE)/100 g de óleo.

Foi utilizada determinação colorimétrica para quantificação dos carotenoides totais, de acordo com Minguez-Mosquera et al. (1991), a partir da diluição da amostra em ciclo-hexano, seguida de leitura em espectrofotomêtro a 472 nm. Os resultados foram expressos como µg/100 g de óleo.

Perfil de tocoferóis e fitosteróis

Foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, High performance liquide chromatography - HPLC) para a determinação dos tocoferóis, conforme método Ce 8-89 (AOCS, 2004), com modificações. Os óleos foram dissolvidos em hexano (grau HPLC) e filtrados em membrana de politetrafluoretileno (PTFE) de 0,22 µm. As amostras foram analisadas em HPLC (Shimadzu, CBM-20A, Quioto, Japão) com detecção de fluorescência RF-10AXL (excitação de 296 nm e emissão de 330 nm), acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (PDA-10A) com duas bombas LC -10AD e injetor automático SIL-10A. Uma coluna de sílica (Shim-pack CLC-SIL. 250 x 4,6 mm de diâmetro interno, com 5 μm) foi usada com hexano e isopropanol (99:1 v/v) como fase móvel. O sistema foi operado isocraticamente com fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 25 μL. A determinação dos tocoferóis presentes nas amostras foi realizada comparando os seus tempos de retenção com os de compostos padrão (α -, β -, γ -, e δ -tocoferol) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), sob as mesmas condições de funcionamento, e a quantificação foi realizada por curva de calibração do padrão. Os resultados foram expressos em mg/kg de óleo.

A determinação de fitosteróis foi realizada por CG, conforme Almeida (2009), com modificações. O padrão 5- α -colestane (1 mg/mL de hexano) foi adicionado em 150 mg de cada amostra. Em seguida, evaporou-se a mistura sob uma corrente de nitrogênio (N₂), antes da saponificação com 5 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) 3 % metanólico a 50 \pm 2 °C em banho termostático durante 3 h. Após mistura com 5 mL de água destilada, o material foi submetido à extração da matéria insaponificável (sobrenadante) com 5 mL de hexano, o qual foi repetido

3 vezes e, após esse procedimento, foi seco em fluxo de N_2 e ressuspenso em volume conhecido (150 μL) de hexano. As amostras foram injetadas em cromatógrafo a gás (Shimadzu, Plus GC 2010, Quioto, Japão) com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida LM5 (5 % fenila, 95 % dimetilpolisiloxano, 60 m x 0,25 mm de diâmetro interno com 0,25 μm de filme/DB-5). A coluna foi submetida a aquecimento de 150°C até a temperatura de 300°C, na razão de 10°C/min, permanecendo a 300°C por 35 min. A temperatura do injetor e do detector foi de 300°C. Foi utilizado hélio (1 mL/min) como gás de arraste; a razão de divisão da amostra no injetor foi de 1/50. A determinação dos fitosteróis foi realizada por meio da comparação dos tempos de retenção das amostras com os padrões: campesterol, estigmasterol e β -sitosterol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos). Os resultados foram expressos em mg/kg de óleo.

Capacidade antioxidante do OAP

O estudo da capacidade antioxidante de óleos vegetais é complexo e deve ser realizado através de pelo menos dois ensaios, com mecanismos de reação diferentes, pois mão existe um único ensaio capaz de determinar, de forma completa ou compreensiva, a capacidade antioxidante dos alimentos (CASTELO-BRANCO; TORRES, 2011).

Atividade de seguestro do radical DPPH

A análise de varredura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*) foi realizada de acordo com Blois (1985) e Brand-Williams et al. (1995), com adaptações. Alíquotas dos óleos foram diluídas com butanol a diferentes concentrações (12,5 a 250 mg/mL) e foram adicionadas à solução de DPPH* 6 x 10-5 mol/L (meio butanólico). A redução do radical DPPH* foi medida a 517 nm em espectrofotômetro após 30 min no escuro. O decréscimo nos valores de densidade ótica das amostras foi correlacionado com os do controle (sem amostra) e, assim, foi estabelecida a % de proteção do antioxidante diante do radical DPPH*, de acordo com a equação: % de proteção = 100 – (absorbância da amostra x 100)/absorbância do controle. Os resultados foram calculados utilizando a equação da reta obtida a partir de uma curva preparada com as diferentes

concentrações da amostra e apresentados como os valores da capacidade de inibição de 50 % do radical (IC_{50}).

Atividade de sequestro do radical ABTS*+

A capacidade antioxidante do óleo da amêndoa de pequi (OAP) foi avaliada também pelo ensaio de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox® (TEAC), de acordo com a Re et al. (1999), adaptado para microplacas. O radical ABTS⁺⁺ foi preparado por adição de persulfato de potássio e a mensuração da TEAC foi feita por comparação da redução da absorção após adicionados 20 μL da fração polar do OAP, do reagente branco ou do padrão Trolox® a 200 μL da solução de ABTS⁺⁺ 7 mM. A absorbância a 734 nm foi monitorada 6 min após a adição do reagente, à temperatura de 25 °C. O valor TEAC foi expresso como TE em micromoles por grama de amostra (TE μmol/g).

ORAC

A capacidade antioxidante lipofílica e hidrofílica do OAP foi determinada utilizando o ensaio ORAC, conforme descrito por Prior et al. (2003). Para o método lipofílico, os óleos foram diluídos em acetona:água (1:1 v/v) com β -ciclodextrina a 7 %; para o método hidrofílico, a fração polar dos óleos foi diluída em tampão de fosfato 75 mM com pH 7,4. As análises foram realizadas em leitor de placas utilizando o 2,2'-azobis (2-amidinopropano) di-hidrocloreto (APPH) como um gerador de radical peroxil, o Trolox® como padrão e a fluoresceína como uma sonda fluorescente. Uma alíquota de 25 μ L da amostra diluída, do branco ou da solução de Trolox® (6,25-100 μ M), foi misturada a 150 μ L de fluoresceína 40 nM e incubada durante 15 min a 37 °C antes da injeção de 25 μ L da solução de AAPH (173 mM). A fluorescência foi registrada a 37 °C, a cada 1 min, durante 100 min, com comprimentos de onda de excitação de 485 (filtro de 485/20) e emissão de 535 nm (filtro de 528/20). Os valores finais de ORAC foram calculados utilizando a área sob as curvas de decaimento e foram expressos como μ mol de TE/100 g de óleo.

Estabilidade oxidativa e termo-oxidativa

A estabilidade oxidativa dos óleos foi determinada em aparelho Rancimat® (Metrohm, 743 Rancimat®, Herisau, Suíça) com o *software* PC 743 Rancimat® 1.0, de acordo com método Cd 12b-92 (AOCS, 2004). Para realização das análises, 3 g dos óleos foram aquecidos a 120°C (fluxo de ar: 20 L/h). O resultado, expresso como período de indução, foi determinado automaticamente a partir do ponto de inflexão da curva (ponto no qual a oxidação é mais rápida).

As propriedades térmicas dos óleos foram determinadas por meio de um analisador termogravimétrico (Shimadzu, DTG-60/60H, Quioto, Japão), nas seguintes condições: temperatura de 25 a 700°C, razão de aquecimento de 10°C/min, atmosfera dinâmica de ar (100 mL/min), utilizando cadinhos de platina abertos contendo 8,6 mg de amostra. O *software* Shimadzu foi usado para analisar os dados das curvas termogravimétrica (TG), primeira derivada termogravimétrica (DTG) e análise térmica diferencial (DTA).

O comportamento térmico dos óleos também foi determinado utilizando as curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) (Shimadzu, DSC-60, Quioto, Japão). O equipamento foi calibrado com o padrão índio metálico de elevada pureza (temperatura de fusão de 156,6 °C). As amostras de óleo (2 mg) foram pesadas em cápsulas de alumínio parcialmente fechadas (orifício central com 0,8 mm) e dispostas sob atmosfera dinâmica de ar (100 mL/min), razão de aquecimento 10°C/min e temperatura de execução entre 25 e 600°C.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos, inicialmente, a teste de *Hartley* para avaliar a homogeneidade das variâncias. As amostras não homogêneas (p < 0,05) foram submetidas ao teste de Box-Cox para transformação. Os resultados foram então analisados por ANOVA univariada, seguida do teste de *Tukey Honest Significant Difference* (HSD) a 5 % de significância, o qual foi aplicado para as amostras homogêneas com o intuito de comparação das médias. No entanto, o teste de *Kruskal-Wallis* foi aplicado aos resultados que permaneceram não homogêneos após transformação por Box-Cox.

No intuito de comparar as amostras de OAP artesanais e prensados a frio, a normalidade e a homogeneidade das variâncias foram determinadas pelo teste de *Shapiro-Wilk*. As amostras não homogêneas (p < 0,05) foram transformadas utilizando-se Box-Cox. As amostras homogêneas foram submetidas ao teste *t-Student* a 5 % de significância, enquanto que o teste de *Mann-Whitney* foi aplicado às amostras não homogêneas.

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos pelo valor médio ± erro padrão. Utilizou-se o programa Statistica 7.1 (Statsoft, Tulsa, Oklahoma, Estados Unidos) para todos os cálculos e todas as análises estatísticas, enquanto os gráficos foram feitos usando-se o *software Prism* 5.0 (GraphPad Software, Inc., Califórnia, Estados Unidos).

Resultados e Discussão

Caracterização físico-química e composição em ácidos graxos

A tabela 1 resume as propriedades físico-químicas e a composição em AG dos OAP extraídos artesanalmente ou por prensagem a frio. Os cromatogramas referentes ao perfil de AG das amostras encontram-se em anexo (ANEXO B). Para o índice de acidez, os valores médios variaram entre 0,42 e 1,89 mg de KOH/g de óleo e encontravam-se dentro do valor estabelecido pelo Codex Alimentarius (ALIMENTARIUS, 1999) para óleos virgens e prensados a frio (4,0 mg de KOH/g de óleo). Esses resultados demonstram a ausência de hidrólise acentuada dos AG componentes dos óleos. Em outro estudo, Mata et al. (2009) e Mariano (2014) encontraram maiores índices de acidez para o OAP extraído por soxhlet (3,86 mg de KOH/g) e por prensagem a frio (3,56 mg de KOH/g), respectivamente.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas e perfil de ácidos graxos (AG) (porcentagem do total de AG) dos óleos da amêndoa de pequi artesanais (PAA) e por prensagem a frio (PAP)

Parâmetros	PAA10	PAA20	PAA30	PAA (média)	PAP11	PAP21	PAP31	PAP (média)
Físico-químicos								
Índice de acidez (mg KOH/g)	0,52±0,00 ^{ab}	0,56±0,08 ^{ab}	0,42±0,00a	0,51±0,07	1,89±0,00 ^b	0,84±0,03 ^{ab}	0,45±0,06 ^{ab}	1,09±0,68
TBA	2,00±0,00a	4,50±0,66 ^b	6,75±0,95°	4,72±2,07	1,50±0,00a	4,91±0,63bc	5,42±0,24bc	4,51±1,55
(ng/g)	2,00±0,00°	4,50±0,00°	0,75±0,95°	4,72±2,07	1,50±0,00°	4,91±0,03	5,42±0,24**	4,51±1,55
Índice de peróxido	1,88±0,17 ^{bc}	1,63±0,18 ^b	4,44±0,15 ^d	2,91±1,44*	2,25±0,35°	0,38±0,08ª	0,37±0,08ª	0,85±0,88
$(mEq O_2/kg)$	1,00±0,17°°	1,03±0,10	4,44±0,15°	2,9111,44	2,25±0,55°	0,30±0,00°	0,37±0,00°	U,00±U,00
Ácidos graxos (%)								
C14:0	0.37 ± 0.00^{d}	$0,34\pm0,00^{a}$	0.35 ± 0.00^{b}	0,35±0,00*	$0,36\pm0,00^{\circ}$	$0,38\pm0,00^{f}$	$0,38\pm0,00^{e}$	0,37±0,00
C16:0	34,88±0,09°	34,56±0,05 ^b	35,51±0,03 ^d	34,92±0,11	33,30±0,02a	35,89±0,04e	35,14±0,03 ^d	34,78±0,39
C16:1	0,55±0,00a	0,52±0,00a	0,52±0,01a	0,53±0,01*	$0,60\pm0,00^{b}$	$0.85\pm0.00^{\circ}$	0,52±0,00a	0,66±0,05
C18:0	2,63±0,01°	2,52±0,01°	2,34±0,05 ^b	2,50±0,04	2,63±0,01°	2,20±0,01a	2,28±0,02ab	2,37±0,07
C18:1	55,14±0,08°	55,41±0,14°	54,35±0,02 ^b	54,97±0,17	55,38±0,03°	53,48±0,07a	54,32±0,02 ^b	54,39±0,28
C18:2	5,85±0,01a	5,94±0,02 ^b	6,54±0,02 ^d	6,11±0,11*	7,23±0,01e	6,39±0,01°	6,59±0,00 ^d	6,73±0,13
Σ AGS	38,46±0,15°	38,13±0,21b	38,59±0,08°	38,39±0,08	36,80±0,05ª	39,28±0,06d	38,56±0,03°	38,21±0,37
∑ AGMI	55,68±0,14°	55,93±0,24°	54,87±0,04 ^b	55,49±0,17	55,98±0,06°	54,33±0,12a	54,85±0,04 ^b	55,05±0,25
∑ AGPI	5,85±0,02a	5,94±0,03b	6,54±0,04 ^d	6,11±0,11*	7,23±0,02e	6,39±0,01°	$6,59\pm0,00^{d}$	6,73±0,13

Valores representam média \pm erro padrão (n = 3), letras diferentes na mesma linha diferem significativamente, de acordo com *Tukey* HSD ou *Kruskal-Wallis* (p < 0,05). *PAA difere estatisticamente de PAP, de acordo com teste *t-Student* ou *Mann-Whitney* (p < 0,05). TBA: teste do ácido tiobarbitúrico. \sum AGS: total de ácidos graxos saturados; \sum AGMI: total de ácidos graxos monoinsaturados; \sum AGPI: total de ácidos graxos poli-insaturados.

Quando avaliado pelo TBA, os valores obtidos (1,50-6,75 ng/g) foram menores do que o recomendado para o óleo de canola refinado (99,0 ng/g) (AOCS, 2004). Esse fato deve ser relacionado com a presença majoritária dos ácidos palmítico e oleico nas amostras, uma vez que o teste é mais sensível a ácidos graxos insaturados (AGI) contendo duas ou mais duplas ligações (SILVA, 2007). O índice de peróxido também foi inferior (0,37 a 4,44 mEq O₂/kg) ao máximo permitido de 15 mEq O₂/kg (ALIMENTARIUS, 1999) para óleos virgens e prensados a frio, indicando boa qualidade em termos de grau de oxidação lipídica.

Não foram observadas diferenças entre amostras artesanais e prensadas a frio com relação aos parâmetros acidez e TBA; no entanto, o índice de peróxido dos óleos prensados a frio foi 70 % inferior ao do óleo artesanal, o que é indicativo de menor degradação oxidativa primária (Tabela 1).

Entre os ácidos graxos saturados (AGS), dois estavam presentes em concentrações elevadas: ácido palmítico (C16:0), que variou de 33,30 % (PAP11) a 35,89 % (PAP21), e ácido esteárico (C18:0), que variou de 2,20 % (PAP21) a 2,63 % (PAA10). Dentre os ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), o ácido oleico (C18:1) apresentou a maior concentração, variando de 53,48 % (PAP21) a 55,41 % (PAA20) (Tabela 1). Essa é uma composição favorável, que garante ao OAP elevada resistência à oxidação. Na amêndoa, Lima et al. (2007) encontraram conteúdos semelhantes de AGS e AGI, 47,17 e 52,48 %, respectivamente.

O conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) foi predominantemente de ácido linoleico (C18:2), que variou de 5,85 % (PAA10) a 7,23 % (PAP11). Embora haja pequena diferença no conteúdo de AGPI nos óleos analisados, o seu valor médio foi maior nos óleos prensados a frio (6,73 %) em comparação com os artesanais (6,11 %). As comparações demonstraram que o teor de AGPI no óleo artesanal é cerca de 9 % inferior ao das amostras prensadas a frio, o que sugere relação entre o tratamento térmico adicional, diferentes tempos de processamento e a oxidação de AGPI nos óleos artesanais, entre outros fatores.

Os níveis de ácido oleico também são semelhantes aos presentes no azeite de oliva (55 a 83 %) (FIRESTONE, 2005). Do ponto de vista da saúde, AGMI estão relacionados com a diminuição do nível de LDL e com a manutenção do nível de lipoproteína de alta densidade (HDL) em seres humanos e em animais. Este é,

certamente, um dos maiores benefícios dos óleos ricos em ácido oleico, como o OAP, em relação a outros óleos de sementes que são altamente poli-insaturados, pois os AGPI são conhecidos por reduzir tanto o colesterol LDL quanto os níveis de HDL séricos no organismo (RAMADAN et al., 2012).

Em geral, os OAP demostraram possuir boa qualidade, que pode ser relacionada com a presença de AGS e AGMI – e menos susceptibilidade à degradação, apesar da heterogeneidade das amostras.

Fenólicos e carotenoides totais

Os teores dos carotenoides e dos compostos fenólicos totais do OAP obtidos por processos artesanais e por pressagem a frio estão apresentados na tabela 2.

O presente estudo revelou elevado teor de compostos fenólicos nos óleos avaliados. Houveram diferenças significativas (p < 0,05) no teor de compostos fenólicos, que variaram de 87,56 (PAP11) a 392,00 mg GAE/100 g de óleo (PAA30), as quais são quantidades significativas quando comparadas com as detectadas na amêndoa, de acordo com Lima et al. (2007) – 122 mg GAE/100 g. Além disso, de acordo com Hoed (2010), em geral, os óleos contêm teores de FT que variam de 10 a 400 mg/100 g de óleo.

Os teores de FT observados no óleo artesanal foram significativamente mais elevados (aproximadamente 55 %) do que nas amostras prensadas a frio. Esse resultado não está de acordo com pesquisa recente, que mostra que os óleos de sementes comestíveis prensados a frio podem reter mais compostos benéficos, incluindo aqueles que são antioxidantes fenólicos naturais (RAMADAN et al., 2012).

Tabela 2. Compostos bioativos presentes nos óleos da amêndoa de pequi artesanais (PAA) e por prensagem a frio (PAP)

Compostos bioativos	PAA10	PAA20	PAA30	PAA (média)	PAP11	PAP21	PAP31	PAP (média)
Fenólicos totais (mg GAE/100 g)	200,89±7,59°	163,11±7,70bc	392,00±6,67 ^d	252,00±31,80*	87,56±6,29ª	155,03±9,05b	96,44±13,08ª	113,01±10,40
Carotenoides totais (μg/100 g) Tocoferóis	262,40±0,56ª	56,84±3,59 ^{ab}	36,03±0,55 ^b	118,42±36,13	159,83±8,72 ^{ab}	68,05±0,86 ^{ab}	41,58±0,37 ^{ab}	89,82±18,09
(mg/kg) α-tocoferol β-tocoferol γ-tocoferol δ-tocoferol	86,21±4,96 ^{ab} n.d. 60,49±3,92 ^a n.d.	80,54±0,65 ^a n.d. 59,96±0,74 ^a n.d.	91,25±4,07 ^{ab} n.d. 84,38±4,67 ^b n.d.	86,00±2,57 n.d. 68,28±5,33 n.d.	79,74±0,29 ^a n.d. 53,53±0,28 ^a n.d.	94,11±0,45 ^{ab} n.d. 46,62±0,29 ^a n.d.	100,06±3,57 ^b n.d. 91,32±2,99 ^b n.d.	91,49±4,01 n.d. 63,82±8,82 n.d.
Tocoferóis totais Fitosteróis	146,57±8,89 ^{ab}	140,50±1,39ª	175,63±8,74 ^{bc}	154,27±7,57	133,27±0,57ª	140,73±0,74ª	191,92±6,56°	155,31±11,78
(mg/kg) Campesterol Estigmasterol β-sitosterol Σ Fitosteróis	41,47±1,56 537,00±16,76 217,63±12,02 796,10±30,01	45,40±7,16 484,04±13,33 204,72±11,17 734,16±28,56	44,00±3,34 555,03±39,99 278,84±25,09 877,86±61,74	43,58±2,56 521,65±15,31 228,09±13,62 793,32±27,63	48,09±1,50 488,43±38,94 232,92±11,56 769,44±49,74	40,76±1,30 482,09±14,05 220,98±10,50 743,83±25,61	38,01±2,22 653,42±106,83 273,16±51,66 964,59±160,71	42,82±1,77 527,30±36,74 238,50±12,90 808,62±49,33

Valores representam média ± erro padrão (n = 3), letras diferentes na mesma linha diferem significativamente, de acordo com *Tukey* HSD ou *Kruskal-Wallis* (p < 0,05). *PAA difere estatisticamente de PAP, de acordo com teste *t-Student* (p < 0,05). n.d.: Resultado não detectado. ∑ Fitosteróis: soma dos fitosteróis campesterol, estigmasterol e β-sitosterol.

Os resultados aqui apresentados indicam que a composição fenólica dos óleos artesanais pode ter sido afetada pela presença de água nesse tipo de extração que atuaria dissolvendo os compostos antioxidantes hidrossolúveis e/ou pelo tratamento térmico a que essas amostras foram submetidas durante a extração, aumentando a concentração de compostos fenólicos após sua liberação de formas conjugadas. Nederal et al. (2012) observaram que os óleos produzidos a partir de sementes de abóbora assadas tinham o dobro da quantidade de FT quando comparados aos das sementes prensadas a frio. Terpinc e colaboradoes (2011) mostraram que o tratamento térmico a 160 °C aplicado a sementes de *Camelina sativa* aumentou o teor de FT, pela liberação de compostos fenólicos insolúveis, enquanto que, abaixo dessa temperatura, conjugados fenólicos solúveis foram liberados de suas formas conjugadas. Assim, sugere-se reconsiderar a afirmação de que apenas os óleos prensados a frio têm os maiores benefícios para a saúde em decorrência dos maiores teores de fenólicos, como muitas vezes é anunciado.

De acordo com Aquino et al. (2009), a análise de carotenoides é importante para determinar a qualidade do óleo extraído, indicando a perda destes compostos muito instáveis durante o processamento. A concentração de carotenoides totais detectada em OAP variou de 36,03 (PAA30) a 262,40 μ g/100 g (PAA10) (Tabela 2), que são quantidades significativas quando comparads com o que Lima et al. (2007) detectaram na amêndoa (295 μ g/100 g).

As amêndoas utilizadas na obtenção dos óleos no presente estudo foram submetidas ao processo de extração na presença de oxigênio, sendo que o uso de altas temperaturas (especialmente nas amostras artesanais) pode ter sido prejudicial, causando redução na quantidade de carotenoides no OAP, porém mais estudos são necessários. Quando comparadas, não houve diferença significativa entre as amostras artesanais e as que foram prensadas a frio.

Perfil de tocoferóis e fitosteróis

A tabela 2 mostra a composição de fitosteróis e tocoferóis do OAP. O teor de tocoferóis totais obtidos a partir dos óleos analisados variou de 133,27 mg/kg (PAP11) a 191,92 mg/kg (PAP31). No entanto, os óleos artesanais e prensados a frio tiveram conteúdo semelhante (154,27 e 155,31 mg/kg, respectivamente).

O principal isômero do tocoferol no óleo da amêndoa do *C. brasiliense* foi o α -tocoferol, com teor entre 79,74 (PAP11) e 100,06 mg/kg (PAP31), que representa 52 a 67 % do total dos tocoferóis. Ele foi seguido pelo y-tocoferol, cujo conteúdo variou entre 46,62 (PAP21) e 91,32 mg/kg (PAP31). De Morais Cardoso, et al. (2013) identificaram α -tocoferol, α -tocotrienol, γ - tocoferol e γ -tocotrienol na polpa de pequi cozido. Estes são os primeiros valores relatados sobre o perfil dos isômeros de tocoferol em OAP, sendo sua presença interessante do ponto de vista nutricional, além de conferir estabilidade e potencial antioxidante ao OAP.

O α - e γ-tocoferóis provaram ser os principais isômeros presentes em óleos e gorduras vegetais, que contribuem para a sua estabilidade contra a oxidação. O isômero α -tocoferol é útil para a nutrição humana e é o antioxidante mais eficaz entre os isômeros do tocoferol (RAMADAN et al., 2012). O nível de α -tocoferol encontrado no OAP no presente estudo se aproxima ao detectado em óleos de sementes de blueberry, framboesa vermelha, amora e cranberry prensados a frio (21-151 mg/kg) (PARRY JR., 2006).

Os teores de fitosteróis dos óleos analisados mostraram valores entre 734,16 e 964,59 mg/kg (estigmasterol, β-sitosterol e campesterol) (Tabela 2). Os cromatogramas referentes ao perfil de fitosteróis das amostras encontram-se em anexo (ANEXO C). Os valores encontrados no presente estudo estão em concordância com os valores relatados na literatura para a maioria dos óleos (1000 a 5000 mg/kg) (GUNSTONE; PADLEY , 1997). Dos fitosteróis encontrados no OAP, o estigmasterol esteve presente em maior quantidade, com valores que variaram entre 482,09 e 653,42 mg/kg, seguido pelo β-sitosterol, com 204,72-278,84 mg/kg e pelo campesterol (48,09-38,01 mg/kg). Matos (2007) relatou que o OAP obtido por prensagem a frio continha β-sitosterol (1200 mg/kg), campesterol (800 mg/kg), e esqualeno (640 mg/kg).

Segundo Almeida (2009), os fitosteróis promovem a redução do colesterol total, porque estes esteróis diminuem a absorção do colesterol exógeno da dieta, reduzindo assim o risco de doença cardíaca.

Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os óleos artesanais e prensados a frio e foram poucos os efeitos de fatores externos sobre a concentração

dos fitosteróis, tais como safra, fatores ambientais ou tipo de extração, confirmando a pouca variabilidade como reportado na literatura (RAMADAN et al., 2012).

Capacidade antioxidante e estabilidade oxidativa do OAP

Para caracterizar o potencial antioxidante do OAP obtido pelos dois tratamentos (artesanal e prensado a frio), os métodos DPPH*, ABTS** e ORAC foram utilizados (os resultados são mostrados na figura 1).

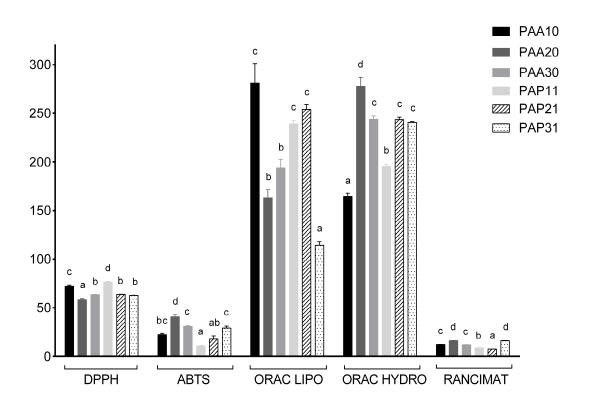


Figura 1. Capacidade antioxidante e estabilidade oxidativa dos óleos da amêndoa de pequi obtidos artesanalmente (PAA) e por prensagem a frio (PAP). Valores representam média \pm erro padrão (n = 3), letras diferentes no mesmo método diferem significativamente, de acordo com *Tukey* HSD ou *Kruskal-Wallis* (p < 0,05). DPPH*: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; ABTS**: 2,2´- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-*ácido* sulfônico); ORAC: capacidade de absorbância do radical oxigênio. Unidades: DPPH: IC_{50} (mg/mL); ABTS**: μ mol TE/g; ORAC: μ mol TE/100 g; Rancimat®: Período de indução (horas).

De acordo com a capacidade antioxidante avaliada através do método DPPH*, a amostra PAA20 teve valor de IC₅₀ baixo (58,48 mg/mL) e, por conseguinte, aumento da atividade de eliminação de radicais DPPH*. Em contraste, a amostra

PAP11 apresentou maior valor de IC₅₀ (76,46 mg/mL). Esses dados demonstram que os compostos bioativos do OAP foram capazes de reagir diretamente com o radical e podem ser benéficos, devido a sua atividade antioxidante. Chen et al. (2014) e Jiao et al. (2014) encontraram valores de IC₅₀ de 8,53 e 152,84 mg/mL em óleos de cominho e de semente de abóbora, respectivamente, utilizando o ensaio de DPPH*.

Pelo método ABTS⁺⁺, a capacidade antioxidante variou de 10,61 μmol TE/g (PAP11) a 40,46 μmol TE/g (PAA20). Kesen et al. (2014) encontraram valores de ABTS⁺⁺ em azeite de oliva entre 1,3 e 1,90 μmol TE/g, que são inferiores aos valores encontrados neste estudo. Amostras de óleo artesanal foram caracterizadas com maior capacidade antioxidante (31,15 μmol TE/g) (p < 0,05) em comparação com as amostras prensadas a frio (19,14 μmol TE/g), quando avaliadas por este método, o que pode ser relacionado com o processamento e com a maior quantidade de fenólicos.

Uma variação de 113,93 (PAP31) a 280,85 µmol TE/100 g (PAA10) foi observada nos OAP avaliados pelo método ORAC lipofílico. Esses valores são maiores do que aqueles encontrados por Eller et al. (2010) em óleos de semente de tomate (0,96-1,47 µmol TE/100 g). Para o extrato hidrofílico, a variação entre as amostras ocorreu de 164,49 (PAA10) a 277,86 µmol TE/100 g (PAA20). De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2010), os valores de ORAC hidrofílico do azeite de oliva extra virgem estão na faixa de 146 a 1150 µmol TE/100 g.

Os óleos avaliados diferiram no tempo de indução da oxidação pelo método Rancimat® (7,33 a 15,91 h), mas, em geral, esses óleos possuem boa estabilidade oxidativa, o que pode ser devido à presença majoritária dos AGS e AGMI, além de outros compostos minoritários. De acordo com Ramadan et al. (2012), a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras vegetais depende da composição de AG, da presença de compostos bioativos lipossolúveis e da quantidade inicial de hidroperóxidos. O óleo de soja refinado (rico em AGPI) apresentou período de indução de 3,87 h, nas mesmas condições do estudo (dados não mostram).

Os óleos estudados demostraram boa capacidade antioxidante e estabilidade oxidativa, mostrando merecer uma posição de destaque em relação a

outros óleos de sementes de frutas, por possuir compostos com possíveis benefícios à saúde e potencial aplicabilidade em processos que utilizam altas temperaturas.

Estabilidade termo-oxidativa

Os dados térmicos (TG/DTG e DSC) das amostras analisadas são semelhantes devido à sua composição química parecida. Eles são mostrados na tabela 3. A figura 2 mostra as curvas das amostras PAA30 e PAP31 em atmosfera de ar.

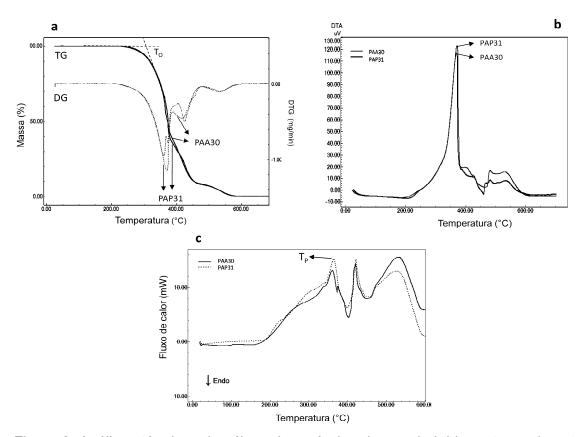


Figura 2. Análises térmicas dos óleos da amêndoa de pequi obtidos artesanalmente (PAA) e por prensagem a frio (PAP) em razão de aquecimento de 10°C/min, atmosfera dinâmica de ar (100 mL/min). (a) curvas TG e DTG (8,6 mg de amostra). (b) DTA (8,6 mg). (c) DSC (2 mg).

Tabela 3. Resumo das análises térmicas dos óleos da amêndoa de pequi obtidos artesanalmente (PAA) e por prensagem a frio (PAP) no primeiro evento em atmosfera de ar e razão e aquecimento 10 °C/minuto

Amostras -	TG/DTG			DSC				
	T _o (°C)	Ti (°C)	Tf (°C)	Perda de massa (%)	T _o (°C)	Ti (°C)	Tf (°C)	T _p (°C)
PAA10	342,90±4,10	212,74±1,90a	379,96±5,28	51,88±2,79	165,13±10,39	160,26±3,00ab	298,82±33,89	164,27±0,60a
PAA20	351,61±17,46	236,32±1,25 ^b	380,40±7,57	53,26±4,39	160,28±13,79	165,98±4,11 ^{bc}	334,04±35,04	173,19±8,35ª
PAA30	348,96±6,53	231,44±2,43b	382,28±7,78	54,79±4,94	175,41±3,26	155,60±2,76ab	302,50±19,19	301,16±17,84b
PAA (média)	347,82±5,66	228,59±3,68	380,88±3,50	53,31±2,11	166,68±5,54	161,24±2,33	312,95±17,50	212,87±28,43*
PAP11	338,20±4,91	208,10±0,74a	381,42±4,22	54,02±0,49	159,58±13,92	151,92±1,67ª	306,81±16,30	304,19±13,76b
PAP21	337,66±4,43	233,59±0,92b	377,82±7,77	52,36±2,21	184,72±2,94	154,75±1,36 ^{ab}	339,58±2,65	319,19±3,57 ^b
PAP31	363,10±13,58	238,71±2,45b	396,80±4,28	63,44±4,93	167,44±9,07	176,24±2,58°	343,59±29,18	321,26±18,00b
PAP (média)	346,32±6,05	226,80±4,80	385,35±4,06	56,61±2,33	169,00±7,09	161,75±4,39	328,80±12,72	312,03±7,15

Valores representam média \pm erro padrão (n = 3), letras diferentes na mesma linha diferem significativamente, de acordo com *Tukey* HSD (p < 0,05). *PAA difere estatisticamente de PAP, de acordo com teste *t-Student* ou *Mann-Whitney* (p < 0,05). TG: curva termogravimétrica; DTG: primeira derivada termogravimétrica; DTA: análise térmica diferencial; DSC: calorimetria exploratória diferencial; T_0 : início extrapolado da oxidação; Ti: temperatura inicial; Tf: temperatura final; T_p : temperatura de ocorrência máxima do evento.

As curvas TG/DTG mostraram pelo menos três eventos de perda de peso (Figura 2a; Tabela 3). O início extrapolado da oxidação (T_o) é usado para comparação da decomposição inicial (MATOS; MACHADO, 2004). O T_o dos óleos analisados variou entre 337 e 363 °C, sem diferenças estatísticas na estabilidade oxidativa. De acordo Saad et al. (2008), o T_o dos óleos tipicamente varia apenas alguns poucos graus centígrados, sendo mais elevado quando o óleo tem maior quantidade de compostos antioxidantes.

O primeiro evento de decomposição, iniciado entre as temperaturas de 208 a 238 °C e terminado entre 377 e 396 °C, com perda de peso de 51 a 63 %, pode ser atribuído à decomposição de AGMI e AGPI. Marques et al. (2015) referiram que a primeiro evento é o mais importante para avaliar a estabilidade térmica de um óleo, uma vez que inicia a decomposição térmica dos AGI. No entanto, de acordo com Vecchio et al. (2009), não há consenso sobre essa atribuição.

O OAP mostrou valores mais elevados do que os observados para o azeite de oliva (160 e 370 °C) relatado por Vecchio et al. (2008) para os primeiros dois picos em sobreposição, demonstrando que o OAP detém melhor estabilidade térmica. De acordo com Smith et al. (2007), a estabilidade oxidativa dos óleos é influenciada pela quantidade e pelo tipo de metal, antioxidantes naturais, fosfolipídeos, AG livres, mono- e diglicerídos, polímeros e pelo número de duplas ligações do óleo.

O segundo evento de decomposição começou à temperatura de 375 a 399 °C e finalizou entre 402 e 440 °C, o que representou de 12 a 22 % de perda de massa. O terceiro evento, com perda de peso de 2 a 29 %, ocorreu no intervalo de temperatura entre 404-441 °C e 477-481 °C. O segundo e o terceiro eventos estão relacionados com a decomposição térmica de AGS e com a decomposição completa de moléculas lipídicas iniciadas no primeiro estágio (VECCHIO et al., 2009). O quarto evento (493-499 °C a 601-614 °C), gerou perda de peso de 7 a 8 % e está relacionado com a decomposição do material polimerizado formado durante o aquecimento. O resíduo obtido no final da decomposição dos óleos é constituído de compostos poliméricos carbonáceos resistentes ao calor (DA FONSECA; YOSHIDA, 2009; VECCHIO et al., 2009).

Os eventos observados nas curvas TG/DTG são transições exotérmicas, como evidenciados pelos picos das curvas DTA (Figura 2b). Esses eventos são característicos da decomposição/combustão resultante da oxidação dos óleos. No primeiro evento exotérmico, ocorreu maior liberação de energia (representada pelo pico mais acentuado), começando entre 190 e 210 °C e tendo temperatura de ocorrência máxima do evento (T_p) entre 344 e 368 °C. Mais estágios de decomposição térmica foram observados – resultantes da oxidação exotérmica e da perda de massa do óleo.

As curvas DSC de todas as amostras apresentaram perfis semelhantes e complexos com pelo menos três picos elevados (Figura 2c; Tabela 3), indicando que a oxidação térmica pode ser caracterizada por pelo menos três eventos exotérmicos atribuídos à volatilização e/ou à combustão de triacilgliceróis.

A oxidação de OAP começou entre 159 e 184 °C (T_o), dentro da faixa de temperatura relatada para óleos comestíveis (130-180 °C) (AGUERREBERE et al., 2011). O primeiro evento térmico começou entre 151 e 176 °C e as amostras PAP31 e PAA20 apresentaram maiores resistências à oxidação – quando comparadas com as outras amostras. Além disso, o primeiro pico DSC ocorreu no intervalo de temperatura de 164,27 a 321,26 °C e as amostras PAP31, PAP21, PAP11 e PAA30 tiveram as temperaturas mais elevadas.

Os 2.°, 3.° e 4.° picos exotérmicos mantidos entre 298-339 °C e 393-404 °C, 393-404 e 448-455 °C e 451-457 °C e 588-594 °C, respectivamente, foram estatisticamente semelhantes entre amostras.

Esses achados são relevantes, uma vez que este é o primeiro relato sobre as características termo-oxidativas do OAP obtidos artesanalmente e por prenssagem a frio, o qual serve de base para mais estudos aprofundados sobre caracterização do óleo.

Conclusões

O presente estudo demonstrou que os OAP extraídos artesanalmente ou prensados a frio possuem boa qualidade físico-química e um bom perfil de AG. Eles têm presença predominante de ácido oleico, além de possuírem compostos

com propriedades antioxidantes, tais como fenólicos, carotenoides, tocoferóis e fitosteróis. Além disso, o óleo possui boas resistências térmica e oxidativa. Essas característias dão ao OAP características de interesse para aplicações alimentares e não alimentares.

Ademais, a presença no óleo de compostos fitoquímicos com efeitos benéficos à saúde chama a atenção para a amêndoa – que é um subproduto comum e geralmente pouco valorizado pelos produtores e consumidores de pequi; com isso, pode ser possível aumentar o número de novos produtos que podem ser desenvolvidos a partir do fruto.

Os óleos artesanais e prensados a frio possuem composições semelhantes; no entanto, o artesanal mostrou menor teor de AGPI, valor mais elevado de peróxidos e de compostos fenólicos totais, além de capacidade antioxidante superior, verificada pelo método de ABTS**, em relação aos prensados a frio. Isso demonstrou a possível influência do tratamento térmico e do tempo de extração dos óleos, sobre a degradação dos AGPI, na formação de peróxidos e na liberação de compostos fenólicos com capacidade antioxidante. Mais estudos são necessários para determinar as variáveis que influenciam esse processo.

Referências

AGUERREBERE, I. A. et al. Characteristics of *Prunus serotina* seed oil. **Food chem,** v. 124, n. 3, p. 983-990, 2011.

ALIMENTARIUS, C. Codex standard for edible fats and oils not covered by individual standards. **Codex stan,** v. 19, p. 1981, 1999.

ALMEIDA, C. **Avaliação dos principais fitosteróis em óleos vegetais e azeites**: *State University of Campinas*. Dissertation (Master of Food Science). Campinas, 2009.

AOCS. Official Methods and recommended Practices of the AOCS. 5 ed. Champaign, Illinois, 2004.

AQUINO, L. P. et al. Influência do pré-tratamento da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) no rendimento do extrato lipídico. **Braz J Food Nutr,** v. 20, n. 2, p. 289-294, 2009.

BERNARDES, T. G. et al. Propagação sexuada do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) estimulada por ácido giberélico. **Pesq Agropec Trop,** v. 38, n. 2, p. 71-77, 2008.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 118, p. 119-1200, 1958.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.-E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food sci Technol,** v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CASTELO-BRANCO V. N.; TORRES, A. G. Total antioxidante capacity of edible vegetable oils: chemical determinants and associations with oil quality. **Rev Nutr,** Campinas, v. 24, n. 1, p. 173-187, 2011.

CHEN, Q. et al. *In vitro* comparison of antioxidant capacity of cumin (*Cuminum cyminum* L.) oils and their main components. **LWT-Food sci Technol,** v. 55, n. 2, p. 632-637, 2014.

DA FONSECA, M. M.; YOSHIDA, M. I. Análise térmica do óleo de linhaça natural e oxidado. **Vértices**, v. 11, n. 1, p. 61-76, 2009.

DA SILVA QUIRINO, G. et al. Healing potential of Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) fruit pulp oil. **Phytochem Lett**, v. 2, n. 4, p. 179-183, 2009.

DA SILVA RABÊLO, A. M. et al. Extração, secagem e torrefação da amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Food Sci Technol (Campinas)**, v. 28, n. 4, p. 868-871, 2008.

DE MORAIS CARDOSO, L. et al. Chemical characteristics and bioactive compounds of cooked pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) from the Brazilian Savannah. **Fruits**, v. 68, n. 1, p. 3-14, 2013.

DE OLIVEIRA, M. L. et al. In vivo topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm. seeds. **J Ethnopharmacol**, v. 129, n. 2, p. 214-9, 2010.

DE OLIVEIRA SOUSA, A. G. et al. Nutritional quality and protein value of exotic almonds and nut from the Brazilian Savanna compared to peanut. **Food Res Int,** v. 44, n. 7, p. 2319-2325, 2011.

ELLER, F. et al. Extraction and analysis of tomato seed oil. **J Am Oil Chem Soc,** v. 87, n. 7, p. 755-762, 2010.

FERREIRA, B. S. et al. Comparative properties of Amazonian oils obtained by different extraction methods. **Molecules**, v. 16, n. 7, p. 5875-85, 2011.

- FIRESTONE, D. Olive Oil. In: Shahidi, F. (6 ed.). **Bailey's Industrial oil and fat products**, New York: Wiley-Interscience, p. 303-331, 2005.
- GUNSTONE, F. D.; PADLEY, F. B. Lipid technologies and applications. CRC press, 1997.
- HOED, V. V. Phenolic compounds in seed oils. **Lipid Technology,** v. 22, p. 247-249, 2010.
- JIAO, J. et al. Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from pumpkin seeds and evaluation of its physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities. **Food Chem,** v. 147, p. 17-24, 2014.
- KESEN, S.; KELEBEK, H.; SELLI, S. LC–ESI–MS Characterization of phenolic profiles Turkish olive oils as influenced by geographic origin and harvest year. **J Am Oil Chem Soc,** v. 91, n. 3, p. 385-394, 2014.
- LEITE, G. et al. Gastroprotective effect of medicinal plants from Chapada do Araripe, Brazil. **J Young Pharm,** v. 1, n. 1, p. 54, 2009.
- LIMA, A. D. et al. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Rev Bras Frutic,** v. 29, n. 3, p. 695-698, 2007.
- MARIANO, R. G. B. Fracionamento e biotransformação de óleos obtidos a partir de frutos do cerrado: Macaúba (*Acrocomia aculeata*) e Pequi (*C. brasiliense* Camb). Federal University of Rio de Janeiro. Thesis (Ph.D. in Sciences). Rio de Janeiro, 2014.
- MARQUES, M. R. et al. Effect of cooking on the thermal behavior of the cowpea bean oil (Vigna unguiculata L. Walp). **J Therm Anal Calorim,** v. 120, n. 1, p. 289-296, 2015.
- MATA, S. J. R., et al. **Extração e caracterização do óleo da amêndoa do pequi** (*Caryocar brasiliense* Camb.) para uso em cosméticos. 49° Congresso Brasileiro de Química: A química e a sustentabilidade. Porto Alegre, Rio grande do Sul, Outubro 04-08, 2009. ABQ Brazilian Association of Chemistry, 2009.
- MATOS, E. H. S. F. **Cultivo do pequi e extração do óleo; dossiê técnico.** Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília CDT/UNB: Brasília, DF (Brazil), 2007.
- MATOS, J.; MACHADO, L. **Análise térmica-termogravimetria. Técnicas de caracterização de polímeros**. In: Canevarolo J. R. and Sebastião, V. Técnicas de Caracterização de Polímeros, p. 209-228. São Paulo: Artliber, 2004.
- MINGUEZ-MOSQUERA, M. I. et al. Color-pigment correlation in virgin olive oil. **J Am Oil Chem Soc,** v. 68, n. 5, p. 332-336, 1991.

- MONTEDORO, G. et al. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. **J Agr Food Chem,** v. 40, n. 9, p. 1571-1576, 1992.
- NEĐERAL, S. et al. Chemical composition and oxidative stability of roasted and cold pressed pumpkin seed oils. **J Am Oil Chem Soc,** v. 89, n. 9, p. 1763-1770, 2012.
- OLIVEIRA, A. J.; RAMALHO, J. Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Produção e Agroenergia. rev. **Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica**, 2006.
- PARRY JR, J. W. Value-adding factors in cold-pressed edible seed oils and flours. ProQuest, 2006.
- PASSOS, X. S. et al. Composition and antifungal activity of the essential oils of *Caryocar brasiliensis*. **Pharm Biol**, v. 41, n. 5, p. 319-324, 2003.
- PRIOR, R. L. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **J Agr Food Chem**, v. 51, n. 11, p. 3273-3279, 2003.
- RAMADAN, M. F.; ASKER, M. M. S.; TADROS, M. Antiradical and antimicrobial properties of cold-pressed black cumin and cumin oils. **Eur Food Res Technol**, v. 234, n. 5, p. 833-844, 2012.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic Biol Med,** v. 26, n. 9-10, p. 1231-7, 1999.
- SAAD, B.; WAI, W. T.; LIM, B. P. Comparative study on oxidative decomposition behavior of vegetable oils and its correlation with iodine value using thermogravimetric analysis. **J oleo sci,** v. 57, n. 4, p. 257-261, 2008.
- SEGALL, S. D. et al. Triacylglycerol analysis of pequi (*Caryocar brasiliensis* Camb.) oil by electrospray and tandem mass spectrometry. **J Sci Food Agric,** v. 86, n. 3, p. 445-452, 2006.
- SILVA, T. O. D. Estudo da emissão de aldeídos e COV por óleos de dendê e soja em diferentes condições, sob aquecimento a temperatura de processos de fritura. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.
- SMITH, S. A.; KING, R. E.; MIN, D. B. Oxidative and thermal stabilities of genetically modified high oleic sunflower oil. **Food Chem,** v. 102, n. 4, p. 1208-1213, 2007.
- SWAIN, T.; HILLIS, W. The phenolic constituents of Prunus domestica. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. **J Sci Food Agric,** v. 10, n. 1, p. 63-68, 1959.

TERPINC, P. et al. Effect of heat treatment of camelina (Camelina sativa) seeds on the antioxidant potential of their extracts. **J Agric Food Chem,** v. 59, n. 16, p. 8639-8645, 2011.

USDA. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of selected foods, Release 2.0, Beltsville, Maryland: U.S. Department of Agriculture, 2010.

VECCHIO, S. et al. Kinetic study of thermal breakdown of triglycerides contained in extra-virgin olive oil. **Therm Anal Calorim**, v. 91, n. 1, p. 51-56, 2008.

_____. Thermal decomposition study of monovarietal extra virgin olive oil by simultaneous thermogravimetry/differential scanning calorimetry: relation with chemical composition. **J Agric Food Chem,** v. 57, n. 11, p. 4793-4800, 2009.

VERA, R. et al. Caracterização física e química de frutos do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) oriundos de duas regiões no estado de goiás, Brasil. **Pesq Agropec Trop,** v. 37, n. 2, p. 93-99, 2007.

2.2 Capítulo 2 – Efeito do óleo da amêndoa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) sobre a injúria hepática aguda induzida pelo tetracloreto de carbono em ratos

^{1,2*}Torres, L. R. O., ¹Santana, F. C., ³Torres-Leal, F. L., ¹Melo, I. L. P., ¹Yoshime, L. T., ⁴Matos-Neto, E. M., ⁴Seelaender, M. C. L., ⁵ Araújo, C. M. M., ⁵Cogliati, B. e ¹Mancini-Filho, J.

¹Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, Caxias, Maranhão, Brasil.

- ³Departamento de Biofísica e Fisiologia, Universidade Federal do Piauí, Piauí, Brasil.
- ⁴Departamento de Biologia Celular, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- ⁵Departamento de Patologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- * Autor correspondente. Email: lucilliaro@usp.br, Tel: + 55-11-30913688.

Resumo

O óleo da amêndoa de pequi (OAP) possui ácidos graxos insaturados e compostos antioxidantes relacionados a efeitos benéficos sobre condições oxidativas e inflamatórias. O presente estudo foi realizado a fim de avaliar os efeitos hepatoprotetores do OAP (artesanal e prensado a frio) sobre injúria hepática aguda induzida por CCl₄, uma potente hepatotoxina, capaz de gerar radicais livres que conduzem ao estresse oxidativo e à inflamação. Os possíveis efeitos sobre as enzimas marcadoras do dano hepático, o perfil lipídico, a peroxidação lipídica, o sistema de defesa antioxidante e desintoxicante, bem como os parâmetros inflamatórios, foram determinados. Os ratos tratados com OAP (3 mL/kg) por 22 dias, antes da indução com CCl₄, não mostraram efeitos sobre os níveis de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase, no entanto aumentaram os níveis séricos de lipoproteína de alta densidade (HDL) comparado ao grupo CCl₄. Além disso, os animais que receberam OAP prensado a frio aumentaram a peroxidação lipídica hepática, em contrapartida, melhoraram a capacidade antioxidante hidrofílica

e aumentaram a atividade da enzima glutationa peroxidase. Em conclusão, o OAP não atenuou as alterações induzidas pelo CCl₄ no tecido hepático de ratos, no entanto, aumentou a capacidade antioxidante nos animais que receberam o OAP prensado a frio.

Palavras-chave: Óleos da amêndoa de pequi, Ácido oleico, Antioxidantes, Inflamação, Hepatoproteção, Tetracloreto de carbono.

Introdução

O pequi é encontrado na Savana brasileira (Cerrado) e pertence à família Cariocaceae e ao gênero *Caryocar* (BERNARDES et al., 2008; VERA et al., 2007). Ele é um fruto drupáceo, constituído de exocarpo (epicarpo) esverdeado; mesocarpo externo e mesocarpo interno (polpa comestível) de coloração amarelada. Além disso, o fruto contém um endocarpo espinhoso protegendo a semente comestível, também chamada de amêndoa ou castanha (CARDOSO et al., 2013; SOUSA et al., 2011).

A amêndoa possui valor energético elevado (aproximadamente 600 kcal/100 g), com alto teor de lipídeos (cerca de 50 %) e de proteínas (25 %) (LIMA et al., 2007). Ela é utilizada para fins culinários, como condimento, em preparações como bolo, pamonha, paçoca, pode ser consumida *in natura* ou torrada para a produção de óleo artesanal, que é obtido utilizando-se de uma técnica rústica, em pequena escala, com água em altas temperaturas (TORRES et al., 2016; DE SOUSA OLIVEIRA et al., 2011; AQUINO et al., 2009). A técnica de prensagem a frio do óleo é um processo ainda não utilizado para a extração do óleo da amêndoa de pequi (OAP), mas que surge como alternativa ao processo artesanal popularmente empregado, por ser referida como uma prática capaz de reter importantes compostos antioxidantes nos óleos (HOED, 2010).

O OAP, além de ser considerado como uma fonte nutricional de lipídeos, também é comumente empregado na medicina popular como anti-inflamatório, para curar feridas e para o tratamento de dores reumáticas e musculares (SARAIVA et al., 2011). A literatura também já relacionou seus efeitos sobre a

redução da resposta inflamatória local, na aceleração da reparação de feridas cutâneas e na melhoria do edema agudo de orelha induzido por xileno, sendo esses efeitos benéficos atribuídos à presença do ácido graxo (AG) ômega 9 (n-9) oleico e aos seus compostos bioativos. Esses dados suportam a utilização do OAP e sugerem implicação potencial sobre condições inflamatórias e pró-oxidantes (CARDOSO et al., 2004; DE OLIVEIRA et al., 2010).

A lesão hepática aguda é o fator de iniciação e uma via comum para o desenvolvimento de muitas doenças do fígado, à qual progride para falência hepática terminal. A lesão hepática prolongada muitas vezes leva à fibrose hepática, à cirrose e, até mesmo, ao câncer de fígado – e estas doenças têm sério impacto sobre o organismo. Atualmente, a lesão hepática aguda ameaça seriamente a saúde humana e provoca grande preocupação (LIU et al., 2014).

O modelo de lesão hepática aguda induzida pelo tetracloreto de carbono (CCl₄) em animais, um clássico modelo de lesão hepática química, é comumente usado para elucidar os mecanismos e a patogênese da lesão hepática (LIU et al., 2014). O CCI4, ao ser metabolizado no fígado, sofre biotransformação aos radicais livres (RL) triclorometil (CCl₃·) e/ou ao radical triclorometil peroxil (CCl₃OO·) e consequentemente, diminui as atividades das enzimas antioxidantes e causa peroxidação lipídica das membranas que leva à lesão hepática (WEBER; BOLL; STAMPFL, 2003). Os metabólitos tóxicos do CCl₄ podem também ativar células de Kupffer a secretar citocinas inflamatórias, tais como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α). Esses metabólitos podem também estimular a produção de fator de transformação do crescimento beta (TGF-β), inibir a formação de óxido nítrico e induzir inflamação e fibrose hepáticas (WILLS; ASHA, 2012).

O TNF-α é um mediador chave das respostas imunes e inflamatórias e controla a expressão de outros genes inflamatórios; consequentemente, a produção excessiva de TNF-α contribui para a manifestação da resposta inflamatória sistêmica e, finalmente, para o desenvolvimento de insuficiência hepática (EBAID et al., 2013).

O aumento da produção de RL gerados pelo CCI₄, que resulta na modificação das vias metabólicas e inflamatórias, pode ser contrabalançado por antioxidantes que impedem ou diminuem o dano hepático através da atividade de sequestro dos RL e do aumento da atividade das enzimas antioxidantes intracelulares, incluindo superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPX) e catalase (CAT) (RAMASAMY et al., 2014). Alguns compostos naturais com propriedades antioxidantes podem contribuir para a redução parcial ou total do dano, podendo possuir papel significativo na manutenção da saúde, quando suplementados ou consumidos como parte da dieta normal (LI et al., 2013).

Diante disso, inexistem dados na literatura a respeito dos efeitos hepatoprotetores do OAP contra agentes xenobióticos, como CCl₄. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do óleo da amêndoa de pequi sobre a injúria hepática aguda induzida por tetracloreto de carbono.

Material e métodos

Amostras

As amostras de óleo, extraídas da amêndoa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) artesanalmente ou por prensagem a frio, foram fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Cerrados, Brasília, Distrito Federal, Brasil). O óleo da amêndoa de pequi artesanal (PAA) foi obtido na cidade de Rio Pardo de Minas na safra 2012/2013 e extraído de acordo Torres et al. (2016). O óleo da amêndoa de pequi prensado a frio (PAP) foi extraído em laboratório da EMBRAPA, utilizando-se de prensa hidráulica (Marconi, MA-098, Piracicaba, Brasil), pressão de 9 ton por 1 h em temperatura ambiente.

Os dois óleos obtidos foram filtrados e armazenados em frascos de vidro âmbar em temperatura de 6 °C. As composições de ácidos graxos do óleo da amêndoa de pequi são mostradas na tabela 1.

Tabela 1. Composições de ácidos graxos dos óleos de amêndoas de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) obtidos artesanalmente (PAA) e por prensagem a frio (PAP)

Compostos	PAA	PAP
Ácidos graxos (%)ª		
Saturados	36,73±0,03*	32,28±0,00
C14:0	0,35±0,00	0,36±0,00
C16:0	33,76±0,03*	29,48±0,00
C18:0	2,62±0,01*	2,44±0,00
Monoinsaturados	57,52±0,14*	61,27±0,03
C16:1	0,59±0,01*	0,66±0,01
C18:1	56,34±0,15*	59,99±0,03
C22:1	0,60±0,01*	0,63±0,01
Poli-insaturados	5,74±0,03*	6,44±0,00
C18:2	5,74±0,03*	6,44±0,00

^{*}PAA difere estatisticamente do PAP, de acordo com o teste t de *Student* ou com o teste de *Mann-Whitney* (p < 0,05).

Animais e delineamento experimental

Os procedimentos, descritos a seguir, foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/USP), conforme o protocolo número 329 (ANEXO D), por estarem de acordo com as normas preconizadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Para avaliar os efeitos do OAP *in vivo*, foram utilizados 32 ratos (*Rattus novergicus*, var. albinus), machos da linhagem *Wistar*, pesando entre 120 e 180 g, provenientes do Biotério de Produção e Experimentação da FCF e do Instituto de Química (IQ) da USP. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração comercial balanceada (Nuvital®, Nuvi Lab CR-1, Curitiba, PR, Brasil) (ANEXO E). Os animais foram suplementados com OAP por via intragástrica (gavagem) durante 22 dias no horário entre 13 e 14 h. Durante todo o período experimental, os animais foram acomodados em gaiolas de polipropileno coletivas (4 animais/gaiola), em condições ambientais adequadas e controladas (temperatura média de 22 \pm 2 °C, umidade relativa de 55 \pm 10 %, com 15 a 20 trocas de ar/h e ciclo biológico invertido – 12 h claro/12 h escuro). Foi adotado período de adaptação inicial de 7 dias e, após este período, os animais foram distribuídos em 4 grupos experimentais:

Controle: receberam água por via oral e injeção intraperitoneal do veículo (azeite de oliva).

CCl₄: receberam água e injeção intraperitoneal de CCl₄.

PAA3: receberam óleo da amêndoa de pequi artesanal, 3 mL/kg de peso corporal, e injeção intraperitoneal de CCl₄.

PAP3: receberam óleo da amêndoa de pequi prensado a frio, 3 mL/kg de peso corporal, e injeção intraperitoneal de CCl₄

O peso e o consumo alimentar dos animais foram monitorados ao longo do ensaio (ANEXO F). O dano hepático foi induzido nos animais no 23.º dia do experimento, por administração de uma dose única intraperitoneal de 3 mL/kg de peso corporal de CCl₄ (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brasil) (70 %, diluído em azeite de oliva). Após 16 h da indução e depois de 8h em jejum, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal, com a mistura de cetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e eutanasiados por exsanguinação.

As amostras de sangue foram coletadas na artéria aorta abdominal e o soro foi separado por centrifugação a 3.500 rpm por 15 min a 4 °C (Sorvall, RC5C, Illinóis, Estados Unidos) para determinação dos marcadores do dano hepático alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e dos marcadores lipídicos colesterol total (CT), triacilgliceróis (TAG) e lipoproteína de alta densidade (HDL), os quais foram realizados por métodos colorimétricos, em analisador bioquímico automático (Labtest®, Labmax 240, Tóquio, Japão), utilizando *kits* comerciais (Labtest®, Lagoa Santa, Brasil). As concentrações da lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram estimadas utilizando a fórmula de Friedewald (FRIEDEWALD; LEVI; FREDRICKSON, 1972).

O tecido hepático de cada animal foi coletado e pesado para posterior cálculo do peso relativo do fígado. Fragmentos do fígado foram homogeneizadas com ultraturrax manual (IKA, T10 basic, Staufen, Alemanha), em volume de tampão de fosfato de potássio (0,1 M pH 7,0) igual a três vezes o valor absoluto da massa da amostra. Os homogeneizados foram centrifugados a 15.000 rpm por 30 min a 4 °C. Os sobrenadantes obtidos foram coletados e mantidos a –80 °C em microtubos

eppendorf até o momento das análises: glutationa reduzida (GSH), capacidade de absorbância do radical oxigênio (ORAC) e atividade de enzimas antioxidantes. Além disso, outros fragmentos do fígado foram rapidamente congelados para determinação do perfil lipídico, malonaldeído (MDA), citocinas e análise de expressão gênica.

Determinação dos lipídeos hepáticos

Os valores de TAG presentes no fígado dos animais foram estimados por método enzimático utilizando *kit* comercial Labtest[®] e a extração prévia foi realizada de acordo com Hara e Radin (1978) e Asadi, Shahriari e Chahardah-Cheric (2010).

Para a determinação do perfil lipídico hepático, os ácidos graxos foram transformados em ésteres metílicos de acordo com o método 996.06 (AOAC, 2002) com adaptações. Inicialmente, foram pesados 400 mg do tecido hepático e adicionados 25 mg de ácido pirogálico, 0,5 mL do padrão interno C13:0 (5 mg/mL em clorofórmio), 0,5 mL de etanol, 2,5 mL de HCl 8,3 M e a mistura foi agitada a 70 - 80 °C por 40 minutos usando vórtex a cada 10 min. Em seguida, a mistura foi esfriada em temperatura ambiente, foram adicionados 6 mL de éter etílico, agitado por 1 min e foram acrescentados 6 mL de éter de petróleo, agitado novamente por 1 min e a mistura foi centrifugada a 2500 g por 10 min. Logo, a fase superior foi transferida para um tubo e o éter foi evaporado lentamente em banho termostático em temperatura inferior a 40 °C com N₂. Foram adicionados 1 mL de reagente BF3 7 % em metanol, 0,5 mL de tolueno e o tubo foi aquecido a 100 °C por 45 minutos e esfriado em temperatura ambiente. Foram adicionados então 2,5 mL de água, 1 mL de hexano e 0,5 g de Na₂SO₄, e agitado por 1 min. A fase superior foi separada e transferida para o *vial* para ser injetado em cromatógrafo a gás (Shimadzu, CG-2010 Plus, Quioto, Japão) com detector de ionização de chama e coluna de sílica fundida (100 m e 0,25 mm de diâmetro interno/SP-2560). Os resultados foram expressos como percentagem de área para cada pico identificado e, em seguida, foram somados os AG – de acordo com o tipo: saturados (AGS), ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI).

Peroxidação lipídica

O teor de MDA nas amostras de fígado foi determinado por *High performance liquide chromatography* (HPLC) (Agilent Technologies 1200 series, Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos), de acordo com Hong et al. (2000). O derivado-conjugado ácido 2-tiobarbitúrico-MDA (25 μL) foi injetado numa coluna analítica C18 (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 μm) (Phenomenex, Torrance, Califórnia, Estados Unidos), acoplada a uma pré-coluna C18 (4 mm x 3 mm i.d.) (Phenomenex, Torrance, Califórnia, Estados Unidos) e transportado por uma fase móvel isocrática constituída por 60 % de tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH 7,4) e 40 % de metanol, à taxa de fluxo de 0,85 mL/min. A quantificação foi feita fluorometricamente a 515 nm de excitação e 553 nm de emissão. A curva padrão foi preparada usando TEP (0,5 a 15,0 μM) e os resultados foram expressos em mmol/mg de proteína.

Determinação da capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante do homogeneizado hepático foi determinada pelo ensaio ORAC hidrofílico e lipofílico, tal como descrito por Prior et al. (2003), em leitor de placas (Biotek®, Synergy HT, Estados Unidos). As amostras lipofílicas foram diluídas em β -ciclodextrina 7 % e as amostras hidrofílicas em tampão de fosfato. Os valores de ORAC foram expressos como nM TE/mg de proteína.

Determinação do conteúdo de GSH e atividade das enzimas antioxidantes

O conteúdo de GSH intracelular e as atividades da SOD, CAT, glutationa redutase (GR) e GPX foram determinados nos homogeneizados do fígado por espectrofotometria, de acordo com métodos descritos a seguir.

Glutationa reduzida: O conteúdo de GSH foi mensurado segundo método descrito por Tietze (1969). Os homogeneizados foram ressuspensos numa solução de EDTA (10^{-3} M) em ácido tricloroacético 5 %, centrifugados a 17000 rpm por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante coletado. Posteriormente, foram colocados em tubo de ensaio 1375 μ L de tampão fosfato pH 8,0 e 100 μ L do sobrenadante contendo GSH. Em seguida, foi adicionado 25 μ L de DTNB (10 mM) dissolvido em acetona, agitado e a absorbância foi medida a 412 nm. A concentração de GSH foi quantificada utilizando uma curva padrão de GSH (50 – 800 μ M) (Sigma-Aldrich,

G4251, St. Louis, Estados Unidos). Os resultados foram expressos em mmol GSH/mg de proteína

Superóxido dismutase: A atividade da SOD foi avaliada de acordo com a metodologia de McCord e Fridovich (1969). O meio de reação foi composto por citocromo C 100 μ M, xantina 500 μ M, EDTA 1 mM e cianeto de potássio 200 μ M em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,8. Para medição de cinética (6 minutos) em espectrofotômetro UV-visível (Varian, modelo Cary 50 Bio, Palo Alto, Estados Unidos) a 550 nm e 25 °C, em cubetas de polietileno, foram adicionadas alíquotas de 1 mL do meio reacional, xantina oxidase (determinada previamente como branco, com variação do delta da absorbância a 550 nm entre 0,025 e 0,030 por minuto) e 15 μ L do homogeneizado de fígado. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína, entendendo-se como unidade (U) a atividade da enzima que promove 50 % de inibição da reação da xantina a 25 °C em pH 7,8.

Catalase: A atividade da CAT foi determinada segundo metodologia descrita por Beutler (1975), utilizando-se meio de reação composto por peróxido de hidrogênio 10 mM (10 μ L de peridrol 30 % em 10 mL de água nanopura), tampão Tris HCl 1 M e EDTA 5 mM em pH 8,0. Para acompanhamento da cinética de atividade (6 minutos) em espectrofotômetro UV-visível a 230 nm a 37 °C, em cubetas de quartzo, foram adicionadas alíquotas de 20 μ L do homogeneizado em 980 μ L do meio reacional. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína, entendendo-se como unidade a atividade da enzima que corresponde à hidrólise de 1 μ mol de H₂O₂ por minuto a 37 °C em pH 8.

Glutationa peroxidase: A atividade da GPx foi determinada conforme metodologia padronizada por Sies et al. (1979). O meio de reação contém glutationa 1 mM, glutationa redutase 0,1 U/mL, NADPH 20 mM, EDTA 5 mM pH 7,0 e tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0. Para medição de cinética (6 minutos) em espectrofotômetro UV-visível a 340 nm e 30 °C, em cubetas de quartzo, foram adicionadas alíquotas de 1 mL do meio de reação, 10 μ L de peróxido de terc-butila 0,5 mM e 10 μ L do homogeneizado de fígado. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína, entendendo-se como unidade a atividade da enzima que oxida 1 μ mol de NADPH por minuto a 30 °C em pH 7.

Glutationa Reduzida: A atividade da GR na fração citosólica foi determinada pela metodologia de Sies et al. (1979). O meio de reação contém glutationa oxidada (GSSG) 50 mM, NADPH 4 mM, EDTA 5 mM pH 7,0 e tampão fosfato de potássio 0,1 M em pH 7,0. Inicialmente, foi tomado o meio de reação e, em seguida, foram acrescentados o homogeneizado da amostra e a solução de peróxido de terc-butila 0,5 mM; a solução foi incubada a 30 °C e as leituras realizadas a cada minuto, no período de 6 minutos. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade da enzima é definida como atividade da enzima que oxida 1 µmol de NADPH por minuto a 30 °C em pH 7,0.

Determinação das concentrações de citocinas

Cerca de 100 mg do fígado foram utilizados para a determinação das concentrações de leptina, interleucinas (IL-1\beta, -6 e -10), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1), TNF-α, receptor ativado por proliferadores de peroxissomagama (PPARy), leucotrienos (LTB) -4 e -5 e prostaglandina E2 (PGE2), segundo Masi et al. (2012). Os tecidos foram homogeneizados em tampão RIPA mM; octilfenoxipolietoxietanol (radio-immunoprecipitation assay) (NaCl 150 (Nonidet P-40®) a 1 %; SDS 1 %; tris (hidroximetil) aminometano (Tris) pH 8,0 50 mM e fluoreto de sódio 10 mM) contendo 10 μg/mL de um coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos). Os homogeneizados foram centrifugados a 12.000 g durante 10 min a 4 °C, o sobrenadante foi recolhido e as determinações foram feitas utilizando-se o kit Milliplex (Millipore, Cat.# HCYTOMAG 60K-20, St. Charles, Missouri, Estados Unidos) em equipamentos Luminex 200 (Luminex Corporation, Austin, TX, Estados Unidos), seguindo as especificações do fabricante.

Expressão gênica

A expressão gênica das enzimas antioxidantes e dos marcadores inflamatórios foi realizada por qRT-PCR (*Real-time reverse transcription polymerase chain reaction*). Inicialmente, o ácido ribonucleico (RNA) foi isolado utilizando-se o reagente Trizol[®] (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos) e seguindo as instruções do fabricante. A concentração de RNA total foi quantificada usando-se

leitor de microplacas. A síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) foi realizada utilizando-se o *kit high capacity cDNA reverse transcription* (Life Technologies, Grand Island, Nova Iorque, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante.

Para a expressão gênica das enzimas antioxidantes, foram misturados 20 ng de cDNA, com 10 μL *TaqMan*® *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, Estados Unidos), 1 μL *TaqMan*® *Gene Expression assay* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, Estados Unidos) específico para cada gene (proteína ribossomal 40S S13 - RPS13, SOD, CAT, GPX e glutationa-S-transferase - GST) e água ultrapura até perfazer o volume final de 20 μL para qRT-PCR, realizada no *StepOne Real Time System* (Life Technologies, Grand Island, Nova lorque, Estados Unidos).

Para a determinação dos marcadores inflamatórios e da citocromo P-450, subunidade 2E1 (CYP2E1), 20 ng de cDNA, 2x SYBR Green fast PCR master mix e primers (Tabela 2) (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos) foram misturados num volume final de 10 μ L para qPCR. Foi utilizado o Quantstudio 12K Real Time System (Life Technologies, Grand Island, Nova Iorque, Estados Unidos) e os níveis de RNAm foram determinados pelo método comparativo Ct (Cycle Threshold). Para o cálculo do gene de interesse de cada amostra, um valor ΔCt foi obtido por subtração dos valores do gene constitutivo RPS13, no caso das enzimas antioxidantes, ou do hipoxantina fosforribosil-transferase 1 (HPRT1), para determinação dos marcadores inflamatórios. O valor do ΔCt médio do grupo controle foi então subtraído das amostras para se derivar um valor $-\Delta \Delta Ct$. A expressão de cada gene foi avaliada por $2^{-\Delta \Delta Ct}$, de acordo com Livak e Schmittgen (2001).

Tabela 2. Sequências dos *primers* utilizados no qRT-PCR

Gene	Sense (5′–3′)	Antisense (5'–3')
HPRT1	GCTTTCCTTGGTCAAGCAGT	TCCAACAAGTCTGGCCTGT
(NM_012583.2)		
TLR4	TCTAAATGCCAACTGGAACAGA	ATGGGATGGATCCAGAAACA
(NM_019178.1)		
TLR2	TTTGATCACTGCACCCTCAA	ATGTGCAGGCTCCGTATTGT
(NM_198769.2)		
IL-1 (NM_013123.3)	AAGTCTTGTGTGCCCTTATC	GTCAAGAGGCAGAGGTTTAC
IL-10	GTGGAGCAGGTGAAGAATG	AGTGTCACGTAGGCTTCTAT
(NM_012854.2)		
ΙΚΚα	TCAAGATGTTGGTGGGAAGATA	CTCTGGGGCCAAATACTGTAA
(NM_001107588.1)		
ΙΚΚβ	GAGAAGCCAAGAGACCAAAG	GGTCTTACTGAGCTGAGAGTA
(NM_053355.2)		
TNF-α	CGTGTTCATCCGTTCTCTAC	GAGCCACAATTCCCTTTCT
(NM_012675.3)	007000.000007.0	
TNFR	CAAGTGCCACAAAGGAACCTAC	ACACTGTCTGACGTGGTTCTG
(NM_013091.1) TGFR-1	400404040400407444	00400047770004044740
. •	ACCACAGAGTAGGCACTAAA	CGAGCGATTTCCCAGAATAC
(NM_009370.3) TGFR-2	CCAACAACATCAACCACAATAC	GGTCTCAAACTGCTCTGAAG
	CCAACAACATCAACCACAATAC	GGTCTCAAACTGCTCTGAAG
(NM_031132.3) TGF-β1	ACAATTCCTGGCGTTACC	GTATTCCGTCTCCTTGGTTC
(NM_021578.2)	ACAATICCIGGCGTIACC	GIATICCGICICCTIGGIIC
(NW_021576.2) CYP2F1	TTCACCAAGTTGGCAAAGCG	CCCCGTCCAGAAAACTCAT
(NM 031543.1)	TICACCAAGTTGGCAAAGCG	CCCCCGTCCAGAAAACTCAT
(14101_0010+0.1)		

HPRT1: hipoxantina fosforribosil-transferase 1; TLR2 e 4: receptores do tipo *Toll* 4 e 2; IL: Interleucinas (1 e 10); IKKα: IkappaB quinase-alfa; IKKβ: IkappaB kinase-beta; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa; TNFR: receptor do fator de necrose tumoral; TGFR1: receptor do fator de transformação do crescimento beta 1; TGFR2: receptor do fator de transformação do crescimento beta 2; TGF-β1: fator de transformação do crescimento beta I; CYP2E1: citocromo P450, subunidade 2E1.

Quantificação das proteínas nos tecidos

A determinação do conteúdo de proteínas presente nos homogeneizados do tecido hepático foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizandose reagente específico (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Califórnia, Estados Unidos) e placas de 96 poços. As leituras foram obtidas em leitor de placas a 595 nm. A quantidade de proteína das amostras foi calculada a partir da curvapadrão, utilizando albumina de soro bovino (0,05-0,5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, A4503, St. Louis, Missouri, Estados Unidos), sendo os resultados expressos com mg de proteína/mL.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos, inicialmente, a teste de *Hartley* para avaliar a homogeneidade das variâncias. As amostras não homogêneas (p < 0,05) foram submetidas ao teste de Box-Cox para transformação. Os resultados foram então analisados por ANOVA univariada, seguida do teste de Tukey *Honest Significant Difference* (HSD) a 5 % de significância, o qual foi aplicado para as amostras homogêneas com o intuito de comparação das médias. No entanto, o teste de *Kruskal-Wallis* foi aplicado aos resultados que permaneceram não homogêneos após transformação por Box-Cox.

As análises foram realizadas em duplicata ou triplicata e os resultados expressos pelo valor médio ± desvio-padrão. Utilizou-se o programa Statistica 7.1 (Statsoft, Tulsa, Oklahoma, Estados Unidos) para todos os cálculos e as análises estatísticas, enquanto os gráficos foram feitos usando-se o *software Prism* 5.0 (GraphPad Software, Inc., Califórnia, Estados Unidos).

Resultados

Biomarcadores séricos de dano hepático e perfil lipídico

As atividades das enzimas ALT e AST foram significativamente maiores no grupo CCl₄ do que no grupo controle após a indução da injúria hepática (Tabela 3). O pré-tratamento com OAP evitou o aumento da ALT e da AST em torno de 30 %, entretanto não foi significativo. A atividade da fosfatase alcalina (FAL) não diferiu entre os grupos controle, CCl₄ e suplementados.

A Tabela 3 também mostra alterações significativas nos níveis de TAG séricos, que aumentou em 156 %, e de HDL, que reduziu em 15 %, após a indução com CCl₄ (p < 0,05); no entanto, nenhum efeito sobre CT foi obervado. Não houve diferença significativa entre os grupos suplementados com OAP quanto aos níveis de TAG, enquanto que o HDL aumentou em todos os grupos tratados (14 e 27 % em PAA3 e PAP3, respectivamente) em relação ao grupo CCl₄ (p < 0,05). Além disso, a suplementação com o OAP aumentou o CT sérico no grupo PAA3 em comparação com os grupos controle e CCl₄ (p < 0,05). As razões LDL/HDL e CT/HDL foram

semelhantes entre os grupos controle e CCl₄; no entanto, a razão LDL/HDL aumentou significativamente no grupo PAA3 em relação aos grupos controle e CCl₄.

Tabela 3. Efeitos dos óleos da amêndoa de pequi obtidos artesanalmente (PAA) ou por prensagem a frio (PAP) sobre marcadores de dano hepático e níveis de lipídeos séricos de ratos induzidos por CCl₄

Parâmetros	Controle	CCI₄	PAA3 + CCI ₄	PAP3 + CCI ₄
Marcadores de				
dano hepático				
(U/L)				
ALT	43,57±6,65a	271,29±41,16 ^b	186,50±38,84 ^{ab}	195,50±57,53 ^b
AST	190,43±22,35a	934,13±172,79bc	747,25±155,07bc	626,33±43,43ac
FAL	160,00±43,43	180,75±43,79	158,25±24,21	180,50±33,59
Lipídeos (mg/dL)				
CT	53,14±4,14a	51,57±6,29 ^a	69,00±9,58 ^b	57,14±6,89 ^a
TAG	33,71±13,90 ^a	86,38±33,30 ^{bc}	85,86±10,42bc	55,38±20,33ac
HDL	23,14±1,35 ^b	19,63±2,13 ^a	22,38±2,00 ^b	24,86±1,35 ^b
LDL	23,26±2,97ab	15,71±6,82a	30,97±7,58 ^b	25,20±3,81 ^b
LDL/HDL	1,01±0,17a	0,94±0,18a	1,35±0,28 ^b	1,04±0,15 ^{ab}
CT/HDL	2,30±0,21a	2,70±0,32ab	3,09±0,36 ^b	$2,35\pm0,33^{a}$

Valores são médias ± desvio padrão (n = 8); diferentes letras em expoente na mesma linha são diferentes significativamente, de acordo com *Tukey* HSD (p <0 ,05) ou *Kruskal-Wallis* (p < 0,05). PAA3 e PAP3: ratos pré-tratados com óleo da amêndoa de pequi (3 mL/kg peso) artesanal ou prensado a frio. ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; FAL: fosfatase alcalina; CT: colesterol total; TAG: triacilgliceróis; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade.

Peso e perfil lipídico hepáticos

O peso relativo do fígado foi significativamente maior em ratos do grupo CCl₄ em comparação com o grupo controle (p < 0,05) (Tabela 4). Esse fenômeno já foi relatado para dano hepática agudo induzido por CCl₄ (HIYOSHI et al., 2009). A administração prévia de OAP a ratos induzidos com CCl₄ não causou alteração significativa no peso relativo do fígado, em comparação ao grupo induzido apenas com CCl₄. Os conteúdos hepáticos de TAG, lipídeos totais, AGS, AGMI e AGPI não sofreram alterações após a indução com CCl₄. No entanto, os AGMI hepáticos aumentaram no grupo que recebeu o óleo prensado a frio (PAP3) em comparação com os grupos CCl₄ .

Tabela 4. Efeitos dos óleos da amêndoa de pequi obtidos artesanalmente (PAA) ou por prensagem a frio (PAP) sobre peso relativo, parâmetros lipídicos e oxidativos do fígado de ratos induzidos por CCl₄

	Controle	CCI ₄	PAA3 + CCI ₄	PAP3 + CCI ₄
Peso relativo do fígado (g/100g peso) Lipídeos	3,17±0,19ª	3,60±0,16 ^b	3,77±0,29 ^b	3,81±0,42b
TAG (mg/g fígado)	6,75±1,12	5,82±0,93	5,78±0,73	6,18±1,33
Lipídeos totais (g/100g fígado)	4,34±0,24	4,65±0,21	4,50±0,20	4,88±0,67
AGS (g/100g fígado)	1,40±0,06 ^a	1,53±0,06 ^{ab}	1,53±0,04 ^{ab}	1,61±0,16 ^b
AGMI (g/100g fígado)	0,32±0,04 ^{ab}	0,28±0,10 ^a	0,36±0,01 ^{ab}	0,46±0,11 ^b
AGPI (g/100g fígado) <i>Oxidativos</i>	2,33±0,19	2,51±0,14	2,25±0,16	2,44±0,29
MDA (mmol/mg proteína) Capacidade antioxidante (nM TE/mg proteína)	3,82±0,72ª	4,27±0,98 ^{ab}	4,12±0,64ª	5,56±1,33 ^b
ORAC hidrofílico	68,37±5,12 ^b	49,43±7,89 ^a	45,70±9,48ª	62,75±8,17 ^b
ORAC lipofílico	16,32±12,49	21,01±12,66	14,00±8,89	17,08±3,75

Valores são médias ± desvio padrão (n = 8); diferentes letras em expoente na mesma linha são diferentes significativamente, de acordo com *Tukey* HSD (p <0 ,05) ou *Kruskal-Wallis* (p < 0,05). PAA3 e PAP3: ratos pré-tratados com óleo da amêndoa de pequi (3 mL/kg peso) artesanal ou prensado a frio. TAG: triacilgliceróis; AGS: ácidos graxos saturados; AGMI: ácidos graxos monoinsaturados; AGPI: ácidos graxos poli-insaturados; MDA: malonaldeído; ORAC: Capacidade de absorbância do radical oxigênio.

Parâmetros oxidativos

Com o intuito de avaliar o efeito do pré-tratamento do OAP sobre a peroxidação lipídica induzida pelo CCl₄ no fígado, os níveis de MDA foram avaliados. O cromatograma referente ao padrão de MDA e uma amostra pode ser observado no Anexo G. Como mostrado na tabela 4, a exposição ao CCl₄ não provocou aumento na peroxidação lipídica no homogeneizado do fígado de ratos; embora houvesse aumento não significativo (12 %) no grupo induzido por CCl₄. Nesse mesmo método, aumento não significativo da oxidação de aproximadamente 30 % ocorreu, no entanto, no grupo tratado com óleo prensao a frio (PAP3) em relação ao grupo CCl₄.

A capacidade antioxidante avaliada pelo método ORAC lipofílico não foi alterada nos grupos; no entanto, houve redução significativa (34 %) da capacidade antioxidante hidrofílica hepática do grupo CCl₄, em comparação com o grupo controle (Tabela 4). Os animais do grupo PAP3 restauraram a capacidade antioxidante hidrofílica nos fígados dos ratos em relação ao grupo CCl₄ (p < 0,05).

Como mostrado na figura 1, o CCl₄ induziu modificações substanciais e significativas na atividade das enzimas antioxidantes hepáticas com o decréscimo das atividades de CAT (28 %), GPX (18 %) e GR (25 %) como resultado da indução do dano pelo CCl₄. Por outro lado, não foi observada nenhuma alteração na atividade da enzima SOD. Além disso, houve diminuição significativa na expressão gênica da GPX (50 %) no grupo CCl₄. Dessas enzimas, apenas a GPX do grupo PAP3 teve sua atividade restaurada (33 %) (p < 0,05).

A figura 1 mostra que a administração do CCl₄ marcadamente não alterou de forma significativa os níveis de GSH hepáticos. Os ratos pré-tratados com OAP também não apresentaram efeito sobre os níveis de GSH, com relação ao grupo CCl₄. A expressão gênica da GST não foi alterada com a indução do dano pelo CCl₄. Por outro lado, houve redução da expressão gênica da GST no grupo PAA3 em relação ao CCl₄ (p < 0,05). No que diz respeito a CYP2E1, os ratos que receberam CCl₄ mostraram diminuição significativa (78 %) no gene em comparação com os ratos controles e os ratos pré-suplementados com OAP não tiveram efeito sobre os níveis de CYP2E1 com relação aos que foram induzidos somente com CCl₄.

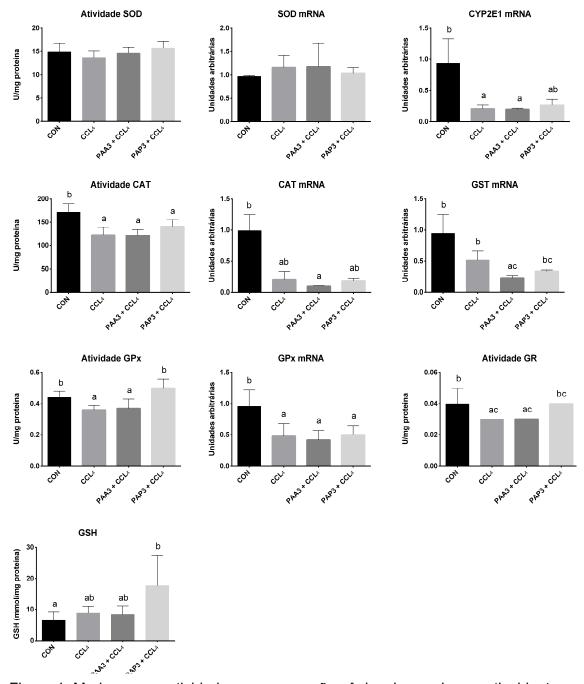


Figura 1. Mudanças na atividade e na expressão gênica das enzimas antioxidantes e desintoxicantes e nos conteúdos de glutationa reduzida (GSH) hepáticos após a administração do óleo da amêndoa de pequi obtidos artesanalmente (PAA) ou por prensagem a frio (PAP) a ratos induzidos com CCI₄. Dados são apresentados em colunas representando média e desvio padrão (n = 8). Letras diferentes no mesmo método diferem significativamente, de acordo com *Tukey* HSD (p < 0,05) ou *Kruskal-Wallis* (p < 0,05). PAA3 e PAP3: ratos pré-tratados com óleo da amêndoa de pequi artesanal ou prensado a frio (3 mL/kg peso), respectivamente. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GPX: glutationa peroxidase; GR: glutationa redutase; GST: glutationa-S-transferase; CYP2E1: citocromo P450 subunidade 2E1.

Concentrações e expressão de gênica de mediadores pró-inflamatórios

As concentrações hepáticas de leptina, IL-6, LTB-4 e LTB-5 e da a razão IL-6/IL-10 foram significativamente mais elevadas no grupo CCl₄ em comparação com as do grupo controle normal. Esse efeito foi diminuído após o tratamento com OAP mas não significativamente (Figura 2). Os níveis de PGE2 não se alteraram significativamente após indução com CCl₄, mas níveis significativamente maiores foram detectados nos grupos tratados com óleo em comparação com o grupo CCl₄ (p < 0,05).

Como mostrado na figura 3, as expressões gênicas do receptor do tipo Toll 4 (TLR4) e do receptor do TNF-α (TNFR) foram significativamente aumentadas em resposta à lesão hepática induzida pelo CCl₄. O TNFR foi regulado negativamente nos animais do grupo PAP3. A razão TNF-α /IL-10 aumentou no grupo PAP3.

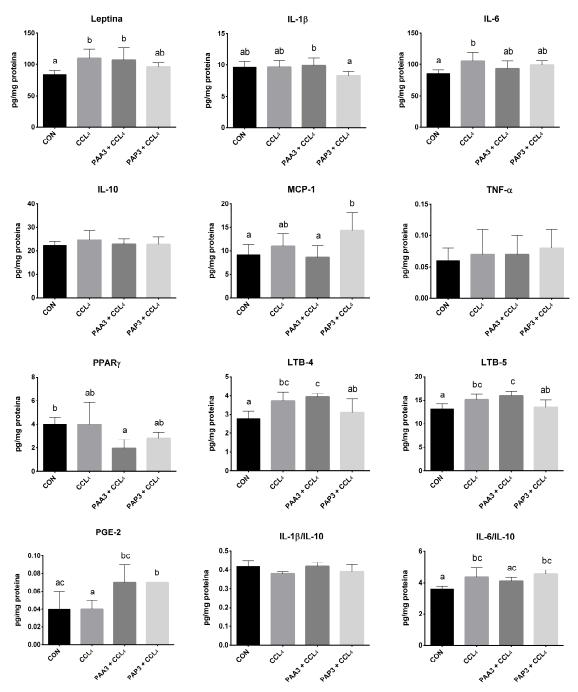


Figura 2. Mudanças nas quantidades de leptina e nas concentrações de parâmetros inflamatórios hepáticos após a administração do óleo da amêndoa de pequi obtidos artesanalmente (PAA) ou por prensagem a frio (PAP) a ratos induzidos com CCl4. Dados são apresentados em colunas representando média e desvio padrão (n = 8). Letras diferentes no mesmo método diferem significativamente, de acordo com *Tukey* HSD (p < 0,05) ou *Kruskal-Wallis* (p < 0,05).). PAA3 e PAP3: ratos pré-tratados com óleo da amêndoa de pequi artesanal ou prensado a frio (3 mL/kg peso), respectivamente. IL-1 β , -6 e -10: interleucinas-1 β , -6 e -10); MCP1: proteína quimiotática de monócitos 1; TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa; PPAR γ : receptor ativado por proliferadores de peroxissoma-gama; LTB -4 e -5: leucotrienos -4 e -5; PGE2: prostaglandina E2.

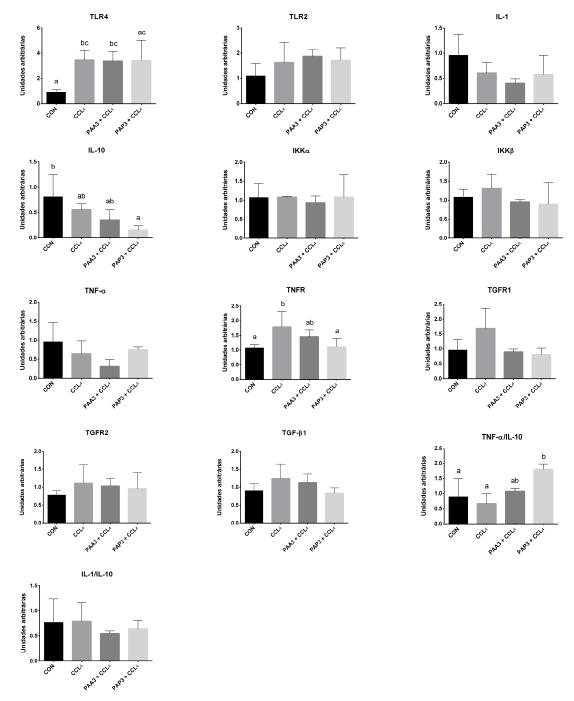


Figura 3. Expressão gênica dos parâmetros inflamatórios hepáticos após administração de óleo da amêndoa de pequi obtidos artesanalmente (PAA) ou por prensagem a frio (PAP) a ratos induzidos com CCI₄. Dados são apresentados em colunas representando média e desvio padrão (n = 8). Letras diferentes no mesmo método diferem significativamente, de acordo com *Tukey* HSD (p < 0,05) ou *Kruskal-Wallis* (p < 0,05).). PAA3 e PAP3: ratos pré-tratados com óleo da amêndoa de pequi artesanal ou prensado a frio (3 mL/kg peso), respectivamente. TLR2 e 4: receptores do tipo Toll 4 e 2; IL-1 e -10: Interleucinas (1 e 10); IKKα: IkappaB quinase-alfa; IKKβ: IkappaB kinase-beta; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa; TNFR: receptor do fator de necrose tumoral; TGFR1: receptor do fator de transformação do crescimento beta 1; TGFR2: receptor do fator de transformação do crescimento beta 1.

Discussão

Sabe-se que o aumento na atividade da ALT é um indicador do grau de dano à membrana das células hepáticas e que a atividade da AST elevada é indicador mitocondrial de dano no fígado. As medidas das atividades da ALT e da AST são os índices mais importantes e eficazes para a avaliação de danos hepáticos (HSU et al., 2009). No presente estudo, a administração de CCl4 produziu dano hepático como evidenciado pelo aumento dos níveis de ALT e AST. Verificou-se que o pré-tratamento com OAP não reduziu significativamente o dano ao fígado induzido pelo CCl4, sugerindo que o OAP não foi capaz de proteger os hepatócitos contra os efeitos tóxicos do CCl4, no entanto evidenciou-se diminuição das atividades de ALT e AST séricas em relação ao grupo CCl4. Na literatura, o óleo da amêndoa (*Prunus amygdalus*), rico em ácido oleico e em compostos bioativos, mostrou efeito benéfico sobre estas enzimas quando os ratos foram induzidos por CCl4 (JIA et al., 2011).

O efeito dos tratamentos com OAP sobre os lipídeos séricos CT, TAG, HDL e LDL foram avaliados. Apesar de o OAP ter aumentado o valor de CT no grupo PAA3, o mesmo não pode ser atribuído ao grupo PAP3. Neste grupo houve redução não significativa do TAG e aumento do HDL (p<0,05). Sugere-se que esses resultados podem ser atribuídos aos níveis significativamente mais elevados de AGMI (7 %) e de AGPI (12 %) e aos níveis inferiores de AGS (12 %) no óleo prensado a frio em comparação ao artesanal (Tabela 1). De fato, Torres et al. (2016) demonstraram que o óleo da amêndoa de pequi artesanal continha menor teor de AGPI quando comparado ao prensado a frio, característica atribuída ao tratamento térmico adicional e, possivelmente, à oxidação dos AGPI, que acontece durante o processo de extração artesanal. Em trabalho semelhante, os óleos de sementes de espinheiro (Hippophae genus) e de amêndoa (P. amygdalus) (ricos em linoleico e oleico) reduziram significativamente os níveis de CT e TAG séricos dos animais tratados em comparação com o grupo CCl₄ (HSU et al., 2009; JIA et al., 2011). Além disso, verificou-se, no presente estudo, que os níveis de HDL dos animais tratados com os dois tipos de OAP foram significativamente superiores aos dos animais não tratados podendo estar relacionado ao aumento do CT verificado, sugerindo propriedade benéfica dos óleos.

Os resultados descritos nesse estudo para a composição lipídica do fígado mostraram que o CCl₄ não alterou os níveis de lipídeos totais no fígado; entretanto, o grupo que recebeu o óleo prensado a frio (PAP3), apresentou maior conteúdo de AGMI em comparação com o grupo CCl₄, o que está relacionado com a maior quantidade de AGMI no óleo.

A peroxidação lipídica é uma das principais causas do dano hepático induzido por CCl4 e é mediada pelos RL derivados desse composto (RAMASAMY, 2014). Na avaliação do estresse oxidativo pelo método MDA, os metabólitos finais dos AGPI peroxidados foram quantificados por cromatografia. Os resultados mostraram pequena estimulação, embora não significativa, nos níveis de MDA no grupo CCl4 em comparação com o grupo controle. A administração de OAP não causou alteração significativa nos níveis de MDA, no entanto, sugeriu atividade estimulante do OAP prensado a frio sobre a peroxidação lipídica, devido, provavelmente, aos altos teores de AGMI susceptíveis à oxidação presentes no tecido hepático (Tabela 4) provenientes do óleo (Tabela 1). Esses dados contradizem os de Cardoso et al. (2004) que relatam que a incorporação de grandes quantidades de ácido oleico às membranas tem sido relacionada como proteção contra a peroxidação lipídica, uma vez que compete com AGPI para inserção nos fosfolipídeos de membrana, já que não é um substrato para oxidases produtoras de mediadores inflamatórios lipídicos.

As enzimas antioxidantes são facilmente inativadas por espécies reativas de oxigênio (ERO) ou peróxidos lipídicos (WANG; XU; LI, 2014). Mesmo com o discreto aumento (12 %) dos níveis de MDA no grupo CCl₄, esse fato pode ter contribuído, ao menos em parte, para a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes observadas no presente estudo em tecido hepático de ratos intoxicados com CCl₄. Os resultados também sugerem que o OAP prensado a frio (grupo PAP3) foi capaz de aumentar a atividade enzimática da GPX nos fígados de ratos induzidos por CCl₄. O aumento da atividade ocorre, possivelmente, devido à propriedade de sequestrar RL dos compostos antioxidantes presentes no óleo inibindo a degradação dessa proteína.

Além disso, a capacidade antioxidante hepática avaliada pelo método ORAC hidrofílico aumentou no grupo PAP3. É possível que o efeito antioxidante verificado nesses métodos aconteceu devido aos constituintes hidrofílicos do OAP com

propriedades antioxidantes e potencial biológico à saúde, tais como os compostos fenólicos ou a sinergia desses com outros constituintes. De acordo com Torres et al. (2016), o OAP possui fenólicos (87,56 a 392,00 mg GAE/100 g), carotenóides (36,03 a 262,40 μ g/100 g), tocoferóis (133,27 a 191,92 mg/Kg) e fitosteróis (734,16 a 964,59 mg/Kg).

Os resultados aqui descritos estão de acordo com a literatura, que atribui, por exemplo, ao óleo da semente de espinheiro e ao óleo de amêndoa (*P. Amygdalus*), aumento significativo na capacidade antioxidante e nas atividades da SOD, CAT, GR e GPX em animais tratados com esses óleos comparados aos animais que receberam CCl₄ (HSU et al., 2009; JIA et al., 2011). Em conjunto, os nossos resultados sugerem efeito antioxidante do OAP (PAP3) sobre os danos induzidos pelo CCl₄ através do aumento da atividade da enzima antioxidante GPX devido à presença de compostos antioxidantes hidrofílicos.

Uma vez que a GSH é também mediada, em grande parte, pela atividade da enzima GST (LI et al., 2013), a análise da sua expressão gênica, bem como da CYP2E1 foi realizada a fim de verificiar o efeito do OAP sobre a expressão gênica dessas enzimas desintoxicantes. Verificou-se, no geral, que no fígado de ratos intoxicados pelo CCI4 não houve alteração na GST. Como esperado, o CCI4 induziu a redução significativa da CYP2E1 (Figura 1), o que indicou que a formação dos RL CCI3 e CCI3OO foi diminuída e, possivelmente, justificou a ausência de estímulo à peroxidação lipídica observada pelo método MDA para o grupo CCI4. Esta desregulação específica da CYP2E1 no dano hepático induzido por CCI4 foi anteriormente relatada por Ogaly et al. (2015) e pode resultar de ataque direto de metabólitos reativos do CCI4 (CHCI3 e CCI3OO), levando a degradação do transcripto da CYP2E1. Além disso, outros mecanismos, tais como a inibição da transcrição da CYP2E1 subsequente a respostas inflamatórias, podem também ter papel na diminuição da CYP2E1. O tratamento com OAP e seus antioxidantes naturais não foram capazes de sequestrar os RL e proteger a degradação CYP2E1.

Os RL, como o CCI₃*, não só causam danos diretos aos tecidos, mas também iniciam a inflamação, ativando macrófagos residentes hepáticos (células de Kupffer) a produzirem e liberarem compostos tóxicos (ERO, eicosanoides e mediadores pró-inflamatórios – IL-6, TNF-α, IL-1β e PGE2), resultando na lesão de

células parenquimatosas (WANG; XU; LI, 2014; IKEJIMA et al., 2001). Sendo consistente com estudos anteriores (WANG; XU; LI, 2014; YAMAJI et al., 2008; IBRAIM et al., 2008), neste estudo houve aumento significativo nos níveis dos marcadores pró-inflamatórios leptina, IL-6, LTB-4 e LTB-5, além da razão IL-6/IL-10, após a administração de CCI₄, confirmando que uma resposta inflamatória foi iniciada no local da lesão.

Estudos recentes mostram que os fitoquímicos de plantas inibem a inflamação, diminuindo a produção de macrófagos, de fatores pró-inflamatórios e também bloqueando o sinal das vias inflamatórias que liberam citocinas (CHO et al., 2013; PONMARI et al., 2014). Foi demonstrado que o OAP não exerceu efeito anti-inflamatório em ratos submetidos a dano hepático agudo induzido por CCI₄, uma vez que os níveis hepáticos dos fatores pró-inflamatórios (leptina, IL-6, LTB-4, LTB-5 e IL-6/IL-10) reduziram, mas não significativamente após o tratamento com o OAP.

De Oliveira et al. (2010) mostraram que a aplicação tópica do óleo da amêndoa de *Caryocar coriaceum* Wittm., espécie do gênero *Caryocar* também denominada de pequi, foi capaz de reduzir a inflamação aguda em edema de orelha induzido por xileno de modo dose-dependente, o que foi associado ao elevado teor de n-9 no óleo.

Neste estudo, o CCI4 não mostrou-se prejudicial o suficiente para causar aumento significativo da PGE2, como observado por Wang, Xu e Li (2014). No entanto, os grupos que receberam o OAP mostraram níveis mais elevados dessa prostaglandina, provavelmente devido aos teores elevados de AG precursores da sua formação (ácido araquidônico e linoleico), associado também com o aumento dos níveis de ácido araquidônico (AA) causado pelo CCI4, o qual, através do dano à membrana, provoca liberação de AA que atua como precursor dos leucotrienos LTB-4 e LTB-5 (MILLER et al., 1993). Este mesmo mecanismo pode explicar ainda o aumento das concentrações de LTB-4 e LTB-5 observado no fígado dos animais do grupo CCI4. Apesar de os animais tratados com OAP mostrarem diminuição nos níveis de LTB-4 e de LTB-5, provavelmente devido à inibição da enzima lipoxigenase (LOX) pelos compostos fenólicos presentes no óleo (ISSA; VOLATE; WARGOVICH, 2006), esse resultado não foi significativo. Dessa forma, mais estudos são necessários para avaliar as características anti-inflamatórias do OAP.

A estimulação da via de sinalização do fator nuclear kappa beta (NF-κβ) e a subsequente transcrição de citocinas e quimiocinas, pode ocorrer através da junção de um ligante a um receptor da superfície celular, tais como TNFR e TLR-4, os quais podem ser ativados pelo TNF-α, no caso do TNFR, ou por lipopolissacarídeo (LPS) ou AGS, no caso do TLR-4 (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009). Neste estudo, as expressões gênicas do TNFR e do TLR-4 foram significativamente aumentadas após indução com CCl₄ e o pré-tratamento com OAP reduziu a expressão apenas do TNFR no grupo PAP3. O TNFR é importante por ser o principal mediador das respostas do TNF-α. Estes dados sugerem alguma implicação preventiva do OAP prensado a frio em condições inflamatórias.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória importante que inibe potencialmente a produção de mediadores pró-inflamatórios (IBRAIM et al., 2008). O tratamento de ratos com OAP não alterou significativamente a expressão de IL-10, exceto no grupo PAP3, que teve menor teor de IL-10 em comparação ao grupo controle e, consequentemente, maior razão TNF-α/IL-10 (Figura 3) em comparação com o grupo CCI₄. Excesso de TNF-α pode indiretamente induzir danos no fígado, por aumentar ainda mais a liberação de RL e de TNF-α de macrófagos (SERBETCI et al., 2012). Consistentemente com esses resultados, foi demonstrado que camundongos deficientes em IL-10 aumentaram a expressão do TNF-α (SIMEONOVA et al., 2001). Os resultados apresentados podem ser relacionados com a maior peroxidação lipídica, avaliada pelo MDA, no grupo PAP3.

Os efeitos observados no presente estudo demonstram que o OAP não produziu efeito significativo e conclusivos sobre a resposta inflamatória aguda induzida pelo CCI₄.

Conclusões

No presente estudo, demonstrou-se que os óleos da amêndoa de pequi, artesanais ou prensados a frio, não atenuaram efetivamente os marcadores bioquímicos enzimáticos relacionados à injúria hepática aguda e a inflamação induzidos pelo tetracloreto de carbono em ratos, com exceção da dimuição da expressão gênica do receptor do fator de necrose tumoral-alfa nos animais que receberam o óleo prensado a frio. Além disso, os animais que receberam os dois

óleos aumentaram os níveis de HDL séricos e da prostaglandina PGE2 hepáticos, o que está relacionado ao efeito dos ácidos graxos presentes nos óleos.

O grupo que recebeu o óleo da amêndoa de pequi prensado a frio, teve aumento dos teores de lipídeos hepáticos susceptíveis à oxidação e, consequentemente, da peroxidação lipídica, no entanto, o mesmo grupo apresentou maior capacidade antioxidante hidrofílica e melhorou o sistema de defesa antioxidante endógeno, através do aumento da atividade da enzima glutationa peroxidase.

Apesar da ausência de um potencial efeito do óleo da amêndoa de pequi em animais submetidos ao dano agudo com tetracloreto de carbono, os achados encontrados no presente trabalho apontam para a necessidade de mais estudos com o óleo em outros contextos metabólicos a fim de fundamentar o seu uso na medicina popular no tratamento de várias afecções, haja vista que algumas evidencias têm destacado efeitos positivos do óleo.

Referências

AOAC - Association of official analytical chemists. **Official Methods of Analysis**, Official Method, n. 996.06, cap.41, p.20-24A, Arlington, USA, 2002.

AQUINO, L. P. et al. Influência do pré-tratamento da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) no rendimento do extrato lipídico. **Braz J Food Nutr,** v. 20, n. 2, p. 289-294, 2009.

ASADI, F.; SHAHRIARI, A.; CHAHARDAH-CHERIC, M. Effect of long-term optional ingestion of canola oil, grape seed oil, corn oil and yogurt butter on serum, muscle and liver cholesterol status in rats. **Food Chem Toxicol**, v. 48, n. 8-9, p. 2454-7, 2010.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arq Bras Endocrinol Metab,** v. 53, p. 646-656, 2009.

BERNARDES, T. G. et al. Propagação sexuada do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) estimulada por ácido giberélico. **Pesq Agropec Trop,** v. 38, n. 2, p. 71-77, 2008.

BEUTLER, E. Red cell metabolism. In: **Manual of Biochemical Methods**. 2ed. New York: Grune & Stratton, 1975. p. 89-90.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem,** v. 72, p. 248-54, 1976.
- CARDOSO, C. R. et al. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. **Wound Repair Regen,** v. 12, n. 2, p. 235-43, 2004.
- CHO, B. O. et al. Hepatoprotective effect of 2,3-dehydrosilybin on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. **Food Chem,** v. 138, n. 1, p. 107-15, 2013.
- DE CARVALHO, E. B. T. et al. Effect of conjugated linoleic acid (CLA) in rats subjected to damage liver induced by carbon tetrachloride. **J Mod Chem Chem Technol**, v. 2, p. 32-42, 2014.
- DE OLIVEIRA, M. L. et al. In vivo topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm. seeds. **J Ethnopharmacol**, v. 129, n. 2, p. 214-9, 2010.
- DE OLIVEIRA SOUSA, A. G. et al. Nutritional quality and protein value of exotic almonds and nut from the Brazilian Savanna compared to peanut. **Food Res Int,** v. 44, n. 7, p. 2319-2325, 2011.
- EBAID, H. et al. Folic acid and melatonin ameliorate carbon tetrachloride-induced hepatic injury, oxidative stress and inflammation in rats. **Nutr Metab (Lond),** v. 10, n. 1, p. 20, 2013.
- FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem,** v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.
- HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 90, n. 1, p. 420-426, 1978.
- HIYOSHI, M. et al. D-Dopachrome tautomerase is a candidate for key proteins to protect the rat liver damaged by carbon tetrachloride. **Toxicology**, v. 255, n. 1-2, p. 6-14, 2009.
- HOED, V. V. Phenolic compounds in seed oils. **Lipid Technology**, v. 22, n. 11, p. 247-249, 2010.
- HONG, Y. L. et al. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. **Clin Biochem,** v. 33, n. 8, p. 619-25, 2000.
- HSU, Y. W. et al. Protective effects of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. **Food Chem Toxicol**, v. 47, n. 9, p. 2281-8, 2009.

- IBRAHIM, Z. S. et al. Protection by Nigella sativa against carbon tetrachloride-induced downregulation of hepatic cytochrome P450 isozymes in rats. **Jpn J Vet Res**, v. 56, n. 3, p. 119-28, 2008.
- IKEJIMA, K. et al. Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals. **Hepatology**, v. 34, n. 2, p. 288-97, 2001.
- ISSA, A. Y.; VOLATE, S. R.; WARGOVICH, M. J. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. **J Food Compos and Anal,** v. 19, n. 5, p. 405-419, 2006.
- JIA, X.-Y. et al. Hepatoprotective effects of almond oil against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. **Food Chem**, v. 125, n. 2, p. 673-678, 2011.
- LI, L. et al. Chlorella vulgaris extract ameliorates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice. **Exp Toxicol Pathol**, v. 65, n. 1-2, p. 73-80, 2013.
- LIMA, A. D. et al. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Rev Bras Frutic,** v. 29, n. 3, p. 695-698, 2007.
- LIU, F. et al. Glutathione S-transferase A1 (GSTA1) release, an early indicator of acute hepatic injury in mice. **Food Chem Toxicol**, v. 71, p. 225-30, 2014.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.
- MASI, L. N. et al. Sunflower oil supplementation has proinflammatory effects and does not reverse insulin resistance in obesity induced by high-fat diet in C57BL/6 mice. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 945131, 2012.
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase, an enzyme function for erythrhrocuprein (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.
- MILLER, A. M. et al. Dietary fish oil supplementation alters LTB4:LTB5 ratios but does not affect the expression of acute graft versus host disease in mice. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 49, n. 2, p. 561-8, 1993.
- OGALY, H. A. et al. Hepatocyte growth factor mediates the antifibrogenic action of Ocimum bacilicum essential oil against CCl4-Induced liver fibrosis in rats. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 13518-35, 2015.
- PONMARI, G. et al. NF-κβ activation and proinflammatory cytokines mediated protective effect of Indigofera caerulea Roxb. on CCl₄ induced liver damage in rats. **Int Immunopharmacol**, v. 23, n. 2, p. 672-80, 2014.

- PRIOR, R. L. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **J Agr Food Chem,** v. 51, n. 11, p. 3273-3279, 2003.
- RAMASAMY, P. et al. Protective effect of chitosan from Sepia kobiensis (Hoyle 1885) cuttlebone against CCl4 induced hepatic injury. **Int J Biol Macromol,** v. 65, p. 559-63, 2014.
- SARAIVA, R. A. et al. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **J Ethnopharmacol**, v. 136, n. 3, p. 504-10, 2011.
- SERBETÇI, K. et al. Anti-apoptotic and antioxidant effect of leptin on CCI₄-induced acute liver injury in rats. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 2, p. 1173-80, 2012.
- SIES, H.; KOCH, O. R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Letters**, v. 103, n. 2, p. 287-290, 1979.
- SIMEONOVA, P. P. et al. The role of tumor necrosis factor-alpha in liver toxicity, inflammation, and fibrosis induced by carbon tetrachloride. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 177, n. 2, p. 112-20, 2001.
- TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 502-522, 1969.
- TIPOE, G. L. et al. Inhibitors of inducible nitric oxide (NO) synthase are more effective than an NO donor in reducing carbon-tetrachloride induced acute liver injury. **Histol Histopathol**, v. 21, n. 11, p. 1157-65, 2006.
- TORRES et al. "Physicochemical and antioxidant properties of the pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil obtained by handmade and cold-pressed processes. **Int Food Res J**, 2016 (*In press*).
- VERA, R. et al. Caracterização física e química de frutos do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) oriundos de duas regiões no estado de Goiás, Brasil. **Pesq Agropec Trop,** v. 37, n. 2, p. 93-99, 2007.
- WANG, Y. H.; XU, X. J.; LI, H. L. Hepatoprotective effects of Mimic of Manganese superoxide dismutase against carbon tetrachloride-induced hepatic injury. **Int Immunopharmacol**, v. 22, n. 1, p. 126-32, 2014.
- WEBER, L. W.; BOLL, M.; STAMPFL, A. Critical Reviews in Toxicology, v.33, p.105-136, 2003.

WILLS, P. J.; ASHA, V. V. Lygodium flexuosum extract down regulates the expression of proinflammatory cytokines in CCl4-induced hepatotoxicity. **Asian Pac J Trop Med,** v. 5, n. 6, p. 421-6, 2012.

YAMAJI, K. et al. Up-regulation of hepatic heme oxygenase-1 expression by locally induced interleukin-6 in rats administered carbon tetrachloride intraperitoneally. **Toxicol Lett,** v. 179, n. 3, p. 124-9, 2008.

3 CONCLUSÕES

No capítulo 1, verificam-se alta porcentagem (55%) de ácido oleico no óleo da amêndoa de pequi extraído artesanalmente ou por prensagem a frio, bem como concentrações elevadas de fenólicos, carotenoides, tocoferóis e fitosteróis. Além disso, observou-se que o OAP encontra-se dentro dos padrões de qualidade exigidos pela legislação e possui elevadas resistências térmica e oxidativa.

Em comparação ao óleo prensado a frio, o óleo artesanal mostrou menores teores de AGPI e maiores quantidades de peróxidos e de compostos fenólicos totais, bem como na capacidade antioxidante verificada pelo método ABTS**, sugerindo uma possível influência do tempo de processamento e/ou do tratamento térmico, utilizado no processo de extração, sobre esses parâmetros. Esses resultados apontam para a necessidade de mais pesquisas focadas no estudo das variáveis que influenciam o processamento do OAP e, consequentemente, a concentração de seus componentes e suas características físico-químicas.

No capítulo 2, apresentam-se os resultados do experimento com ratos submetidos à injúria hepática aguda induzida pelo tetracloreto de carbono. Foi observado que a suplementação prévia com OAP não atenuou os marcadores de dano e inflamatórios. Além disso, o OAP prensado a frio aumentou a peroxidação lipídica hepática nos animais, no entanto, melhorou o sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático.

Os resultados aqui apresentados contribuem para a valorização e o conhecimento físico-químico e biológico do óleo obtido a partir de um subproduto, rico em ácidos graxos e compostos bioativos, geralmente descartado, do fruto do pequi. No entanto, mais estudos fazem-se necessários para elucidar e justificar o uso do óleo da amêndoa de pequi na medicina popular, bem como conferir efeitos benéficos a condições clínicas e patológicas.

REFERÊNCIAS

- BELANGER, M.; BUTTERWORTH, R. F. Acute liver failure: a critical appraisal of available animal models. **Metabolic Brain Disease**, New York, v. 20, n. 4, p. 409-423, 2005.
- Cardoso L. M. et al. Chemical characteristics and bioactive compounds of cooked pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) from the Brazilian Savannah. **Fruits**., v. 68, n. 1, p. 3-14, 2013.
- CHONG, E. W. T.; SINCLAIR, A. J.; GUYMER, R. H. Facts on fats. Clinical and Experimental Ophthalmology, v. 34, n. 5, p. 464-471, 2006.
- DA SILVA QUIRINO, G. et al. Healing potential of Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) fruit pulp oil. **Phytochem Lett,** v. 2, n. 4, p. 179-183, 2009.
- DE OLIVEIRA, M. L. et al. *In vivo* topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm. seeds. **J Ethnopharmacol**, v. 129, n. 2, p. 214-9, 2010.
- DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 9, p. 505-512, 2006.
- GARCIA, C. et al. Thermal stability studies of some cerrado plant oils. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, n. 3, p. 645-648, 2007.
- HSU, Y. W.; TSAI, C. F.; CHEN, W. K.; LU, F. J. Protective effects of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.2281-2288, 2009.
- JIA, X.-Y. et al. Hepatoprotective effects of almond oil against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. **Food chemistry**, v. 125, n. 2, p. 673-678, 2011.
- LEITE, G. O. et al. Gastroprotective effect of medicinal plants from Chapada do Araripe, Brazil. **Journal of Young Pharmacists,** v.1, p.54-56, 2009.
- LIMA, A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). 2008. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- LI, L.; LI, W.; KIM, Y. H.; LEE, Y. W. *Chlorella vulgaris* extract ameliorates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.65, p.73-80, 2013.
- LIU, F.; et al. Glutathione S-transferase A1 (GSTA1) release, an early indicator of acute hepatic injury in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.71, p.225-230, 2014.

- MAHESWARI, M. U.; RAO, P. Antihepatotoxic effect of grape seed oil in rat. **Indian journal of pharmacology**, v. 37, n. 3, 2005.
- MARIANO, R. D. B. Extração do óleo da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense*) por processos convencionais combinados com tecnologia enzimática. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- MARIANO, R. G. B.; COURI, S.; FREITAS, S. P. Enzymatic technology to improve oil extraction from *Caryocar brasiliense* Camb. (pequi) pulp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.31, n.3, p.637-643, 2009.
- MARTINS, P. F. Estudos e experimentos para a concentração de tocoferóis e fitoesteróis por meio da destilação molecular. 2006. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Universidade estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- MATOS, E. H. S. F. **Cultivo do pequi e extração do óleo. Dossiê técnico.** Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília CDT/UNB, 2007.26p. Disponível em: http://www.respostatecnica.org.br/dossietecnico/downloadsDT/Njg=. Acesso em 12/09/2012.
- OLIVEIRA, W. L. Ecologia populacional e extrativismo de frutos de *Caryocar brasiliense* Camb. no cerrado do norte de Minas Gerais. 2009. Dissertação (Mestrado em Ecologia) Universidade de Brasília, Brasília, 2009.
- PARRY JR, J. W. Value-adding factors in cold-pressed edible seed oils and flours. ProQuest, 2006.
- PASSOS, X. S. et al. Composition and antifungal activity of the essential oils of *Caryocar brasiliensis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n. 5, p. 319-324, 2003.
- POZO, O. V. C. **O pequi (***Caryocar brasiliense***):** uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do cerrado no norte de Minas Gerais. 1997. Dissertação (Mestrado em Administração Rural) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.
- RAMADAN, M. F.; ASKER, M. M. S.; TADROS, M. Antiradical and antimicrobial properties of cold-pressed black cumin and cumin oils. **Eur Food Res Technol,** v. 234, n. 5, p. 833-844, 2012.
- RAMASAMY, et al. Protective effect of chitosan from *Sepia kobiensis* (Hoyle 1885) cuttlebone against CCl₄ induced hepatic injury. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.65, p.559-563, 2014.
- ROESLER, R. et al. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterisation of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.110, p.711-717, 2008.

SILVA, et al. Benefícios do pequi brasileiro (*Cariocar brasiliensis*), uma fruta nativa das regiões de Cerrado do Centro-Oeste. **Revista conexão eletrônica**, v.9, n.1/2, 2012.

SOUSA A. G. O. et al. Nutritional quality and protein value of exotic almonds and nut from the Brazilian Savanna compared to peanut. **Food Res Int.**, v.44, p.2139-2325, 2011.

VASSILIOU, E. K. et al. Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF-alpha both *in vitro* and *in vivo* systems. **Lipids in Health and Disease**, v.8, p.25, 2009.

VERA, R. et al. Caracterização física e química de frutos do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) oriundos de duas regiões no estado de Goiás, Brasil. **Pesq Agropec Trop,** v.37, n.2, p.93-99, 2007.

VOICAN, C. S.; PERLEMUTER, G.; NAVEAU, S. Mechanisms of the inflammatory reaction implicated in alcoholic hepatitis, update. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v.35, n.6-7, p.465-474, 2011.

WANASUNDARA, P.; SHAHIDI, F.; SHUKLA, V. Endogenous antioxidants from oilseeds and edible oils. **Food Reviews International**, v.13, n.2, p.225-292, 1997.

WEBER, L. W.; BOLL, M.; STAMPFL, A. Critical Reviews in Toxicology, v.33, p.105-136, 2003.

WILLS, P. J.; ASHA, V. V. *Lygodium flexuosum* extract down regulates the expression of proinflammatory cytokines in CCl₄-induced hepatotoxicity. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p.421-426, 2012.

ANEXOS

ANEXO A – Carta de aceite do artigo

International Food Research Journal

(ISSN 22317546)

Tel: 603-89468419 // Fax: 603-89423552

Email: ifrj@upm.edu.my

Website: http://www.ifrj.upm.edu.my



UPM/FSTM/A/SR/15/331 28th December 2015

Dear Lucillia Rabelo de Oliveira,

MANUSCRIPT IFRJ-2015-331

Your Manuscript entitled "Physicochemical and antioxidant properties of the pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil obtained by handmade and coldpressed processes" by Torres, L. R. O., Shinagawa, F. B., Santana, F. C., Araújo, E. S., Oropeza, M. V. C., ¹Macedo, L. F. L., Almeida-Muradian, L. B., Lima, H. C. and Mancini-Filho, J.. has been accepted for publication in the International Food Research Journal. We thank you for your contribution to the International Food Research Journal and encourage you to submit other articles to the Journal.

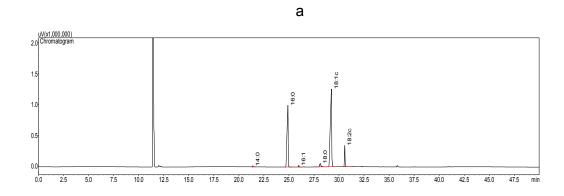
Please fill and sign the attached forms and return to me to enable us to process your manuscript for publication.

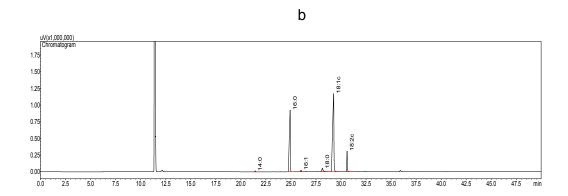
Thank you. Yours sincerely,

Professor Dr. Son Radu

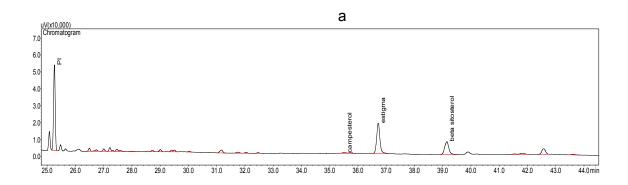
Editor, International Food Research Journal

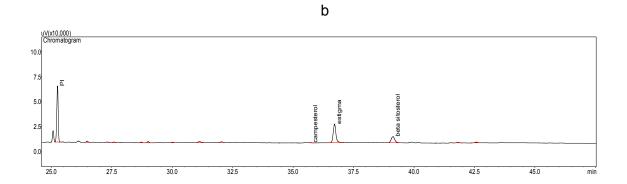
ANEXO B – Cromatogramas correspondentes ao perfil de ácidos graxos dos óleos da amêndoa de pequi obtidos artesanalmente (a) (amostra PAA30) ou (b) por prensagem a frio (amostra PAP31)





ANEXO C – Cromatogramas correspondentes ao perfil de fitosteróis dos óleos da amêndoa de pequi obtidos artesanalmente (a) (amostra PAA30) ou (b) por prensagem a frio (amostra PAP31)





ANEXO D - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Oficio CEUA/FCF/68/2011

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "Caracterização de óleos da amêndoa de pequi (Caryocar brasiliense Camb.) obtidos artesanalmente e por prensagem a frio e avaliação sobre processos oxidativos em ratos" (Protocolo CEUA/FCF/329), de responsabilidade da pesquisadora Lucillia Rabelo de Oliveira sob a orientação do Prof. Jorge Mancini Filho, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 04 de julho de 2011.

São Paulo, 06 de julho de 2011.

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

CEUA/FCF/USP

ANEXO E – Ração comercial utilizada para animais no experimento biológico

Nuvilab CR-1

Composição do Produto: Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e aminoácidos.

Níveis de Garantia por Quilograma do Produto:

Umidade (máx)	12,50	%
Proteína Bruta (min)	22,00	%
Extrato Etéreo (min)	4,50	%
Matéria Mineral (máx)	10,00	%
Matéria Fibrosa (máx)	8,00	%
Cálcio (máx)	1,40	%
Fósforo (min)	0,80	%

Enriquecimento por Quilograma do Produto:

Vitaminas:Vitamina A 12.000,00 UI; vitamina D3 1.800,00 UI; vitamina E 30,00 mg; vitamina K3 3,00 mg; vitamina B1 5,00 mg; vitamina B2 6,00 mg; vitamina B6 7,00 mg; vitamina B12 20,00 mcg; niacina 60,00 mg; ácido pantotênico 20,00 mg; ácido fólico 1,00 mg, biotina 0,05 mg; colina 600,00 mg.

Microelementos Minerais:Ferro 50,00 mg; zinco 60,00 mg; cobre 10,00 mg; iodo 2,00 mg; manganês 60,00 mg; selênio 0,05 mg; cobalto 1,50 mg.

Aminoácidos: Lisina 100,00 mg; metionina 300,00 mg.

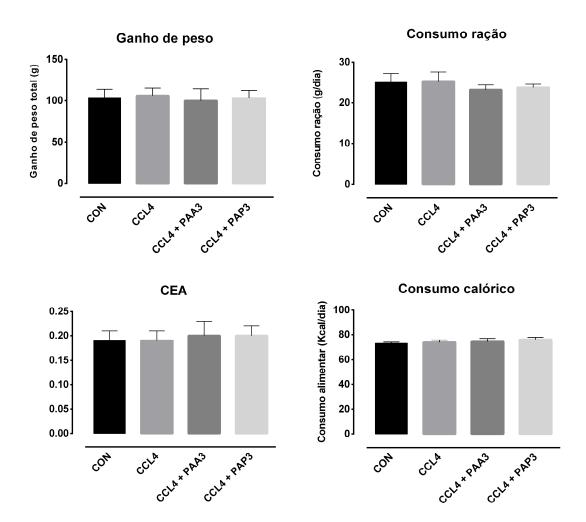
Aditivos: Antioxidante 100,00 mg.

Indicação: Alimento equilibrado para camundongos e ratos de laboratório, baseado em recomendações do NationalResearchCouncil e NationalInstituteof Health – USA.

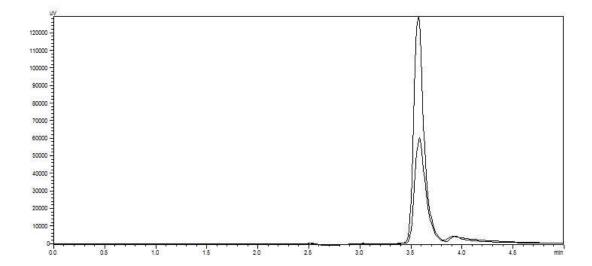
Uso: Administração à vontade através de comedouros suspensos.

Apresentação: Peletizada (extrusada ou farelada sob consulta).

ANEXO F – Ganho de peso corpóreo total, Consumo de ração, Coeficiente de eficácia alimentar (CEA) e Consumo calórico total de ratos induzidos com tetracloreto de carbono



ANEXO G – Cromatograma referente ao padrão e malonaldeído (MDA) hepático de um animal



ANEXO H – Ficha do aluno

Janus - Sistem a Adm inistrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9131 - 6342740/2 - Lucillia Rabelo de Oliveira Tôrres

Email: lucilliaro@usp.br Data de Nascimento: 18/01/1984

Cédula de Identidade:RG - 2.133.014 - PILocal de Nascimento:Estado do Piauí

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Nutricionista - Universidade Federal do Piauí - Piauí -

Brasil - 2007

Mestrado: Mestre em Ciências - Área: Bromatologia - Faculdade

de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São

Paulo - São Paulo - Brasil - 2010

Curso: Doutorado

Programa: Ciência dos Alimentos

Área:BromatologiaData de Matrícula:23/03/2011Início da Contagem de Prazo:23/03/2011Data Limite para o Depósito:22/03/2016

Orientador: Prof(a). Dr(a). Jorge Mancini Filho - 23/03/2011 até o

presente. Email: jmancini@usp.br Inglês, Aprovado em 23/03/2011

Trancamento(s): 365 dias

Período de 18/04/2012 até 17/04/2013

Data de Aprovação no

Proficiência em Línguas:

Exame de Qualificação: Aprovado em 07/05/2014

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da Banca: Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa: Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 23/03/2011

Trancado em 18/04/2012

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 08/02/2016

Impresso em: 17/03/2016 09:34:04

Janus - Sistem a Adm inistrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas Documento sem validade oficial FICHA DO ALUNO

9131 - 6342740/2 - Lucillia Rabelo de Oliveira Tôrres

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred	.Freq.C	onc. E	xc.S	Situação
HNJ/ <u>5</u> 737-	Ciência de Alimentos (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	11/05/2011	22/06/2011	60	4	100	Α	N	Concluída
FBA5900- 1/2	Biomodelos Experimentais Aplicados na Avaliação de Alimentos	08/08/2011	14/08/2011	30	2	100	Α	N	Concluída
FBA5728- 3/3	Aprimoramento Didático	12/09/2011	09/10/2011	60	4	87	Α	N	Concluída
HNT5759- 1/2	Nutrigenômica no Contexto das Doenças Crônicas não Transmissíveis (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	04/10/2011	08/11/2011	60	4	100	Α	N	Concluída
FBA5702- 4/2	Compostos Bioativos em Alimentos e sua Relação com a Saúde	06/03/2012	09/04/2012	30	2	80	Α	N	Concluída
HNT5758-	HNT5758-Doenças Crônicas não Transmissíveis								
1/3	do Espectro da Síndrome Metabólica:Fisiopatologia, Epidemiologia e Controle (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	13/03/2012	24/04/2012	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
NHA5705 2/4	- Fundamentos da Biologia Molecular NHA5705- Aplicados à Nutrição Humana (Curso Interunidades: Nutrição Humana Aplicada - Universidade de São Paulo)	28/05/2012	01/07/2012	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBF5805- 1/2	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	14/08/2013	17/09/2013	45	3	100	В	N	Concluída
VPT5781- 1/2	Hepatologia Experimental e Comparada (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo	22/09/2014	26/10/2014	90	6	90	Α	N	Concluída
QBQ5747- 8/1	Animais de Laboratório (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	24/11/2014	30/11/2014	15	0	-	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos	Créditos mínimos exigidos		
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese		
Disciplinas:	0	20	25	
Estágios:				
Total:	0	20	25	

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência. Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Janus - Sistem a Adm inistrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9131 - 6342740/2 - Lucillia Rabelo de Oliveira Tôrres

	Comissão julgadora da	tese de doutorad	0:
NUSP	Nome	Vínculo	Função
43102	Jorge Mancini Filho	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 08/02/2016 **Impresso em:** 17/03/2016 09:34:04

ANEXO I – Currículo Lattes













Lucillia Rabelo de Oliveira Torres

Endereço para acessar este CV:http://lattes.cnpq.br/6640935159713454

Última atualização do currículo em 18/03/2016

Resumo informado pelo autor

Professora do Ensino Básico Técnico e Tecnológico do Instituto Federal do Maranhão, graduada em Tecnologia em Alimentos pelo Centro

Federal de Educação Tecnológica do Piauí (2007) e em Nutrição pela Universidade Federal do Piauí (2007). Mestre em Ciências pelo programa Ciência dos Alimentos da Universidade de São Paulo (2010) e atualmente é doutoranda pelo mesmo programa. Tem experiência na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, com ênfase em Tecnologia de Produtos de Origem Vegetal, atuando principalmente nos seguintes temas: atividade antioxidante, óleos vegetais, compostos bioativos.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome Lucillia Rabelo de Oliveira Torres

Filiação José Ferreira de Oliveira e Creusa da Conceição Rabelo de Oliveira

Nascimento 18/01/1984 - Teresina/PI - Brasil

Formação acadêmica/titulação

2011 Doutorado em Ciências dos Alimentos.
Universidade de São Paulo, USP 2010 Paulo, Brasil
Título: Caracterização de óleos da amêndoa de pequi (Caryocar brasiliense Camb.) obtidos artesanalmente e por prensagem a frio e avaliação sobre processos oxidativos em ratos.

Orientador: Jorge Mancini Filho

2008 - 2010 Mestrado em Ciências dos Alimentos Daulo, Brasil
Universidade de São Paulo, USP De Paulo, Brasil
Título: Avaliação dos compostos fenólicos e das propriedades antioxidantes da polpa do pequi (Caryocar spp) processado e in natura, Ano de obtenção: 2010

Orientador: Jorge Mancini Filho Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2002 - 2007

Graduação em Nutrição. Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil

2001 - 2007

Graduação em Tecnologia em Alimentos. Centro Federal de Educação Tecnológica do Piauí, CEFET-PI, Brasil

Título: Caracterização Físico-química do óleo bruto de coco babaçu (Orbignya spp) comercializado na zona rural de José de Freitas-PI Orientador: Suzane Fialho Silva

Formação complementar

2013 - 2014 Curso de curta duração em Espanhol A1. (Carga horária: 60h).

Universia Brasil, UNIVERSIA, Sao Paulo, Brasil

2013 - 2013 Oficina de cacau e chocolate. . (Carga horária: 6h).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

2013 - 2013 Capacitação em Estatística Multivariada. . (Carga horária: 40h). Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

2006 - 2006 Inglês Instruental I. . (Carga horária: 60h). Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil

2003 - 2004 Inglês Instrumental II. . (Carga horária: 60h). Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil

Atuação profissional

Instituto Federal do Maranhão -IFMA

Atual Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Professor EBTT, Regime: Dedicação exclusiva

Atividades

04/2012 - Atual Outro

Especificação:

Especimioação. Aspectos Gerais do Leite , Conservação de Alimentos , Conservação do Leite e de Produtos Derivados , Conservação e Controle Higiênico Sanitário de Alimentos , Processamento de Produtos de Origem Vegetal

2. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2011 - Atual Vínculo: Aluno de Doutorado, Enquadramento funcional: Aluno de Doutorado, Carga horária: 40, Regime:

2009 - 2009 Vínculo: Aluna de Mestrado , Enquadramento funcional: Aluna PAE - Bromatologia Básica , Carga horária: 8, Regime: Parcial Outras informações:

Odusa informações.

Atividades didaticas desenvolvidas no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) cujo objetivo é aprimorar a formação do pós-graduando para atividade didática de graduação junto à disciplina FBA (Bromatologia Básica para graduação em Nutrição, do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental/FCF/USP, sob a orientação da prof. Elizabete Wenzel de Meneses.

2008 - 2010 Vinculo: Bolsa de mestrado , Enquadramento funcional: Bolsista de mestrado , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

3. Universidade Federal do Piauí - UFPI

Vínculo

institucional

2002 - 2007 Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Estudante , Carga horária: 30, Regime: Parcial

09/2005 - 12/2005 Estágio, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição

Estágio:

Hospital Geral do Buenos Aires, da Fundação Municipal de Saúde – Prefeitura Municipal de Teresina Piauí -Área de Alimentação Institucional

4. Instituto Federal do Piauí - IFPI

Vinculo institucional

2001 - 2007 Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Estudante , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

06/2006 - 01/2007 Estágio, Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Costa Alvarenga (LACEN-PI)

Estágio: Área de Bromatologia

5. Hospital São Marcos - HSM*

Vinculo institucional

2005 - 2005 Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 36, Regime: Parcial

01/2005 - 06/2005 Estágio, Associação Piauiense de Combate ao Câncer

Estágio: Serviço de Nutrição

6. Panificadora Ideal Ltda - IDEAL

Vinculo

institucional

2007 - 2008 Vínculo: Prestador de Serviço , Enquadramento funcional: Livre , Carga horária: 20, Regime: Dedicação exclusiva

Atividades

09/2007 - Atual Servico Técnico Especializado, Ideal

Especificação:

7. Instituto Butantã - IB

Vinculo

institucional

2008 - 2008 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

05/2008 - 09/2008 Estágio, Instituto Butantã - SP

Estágio realizado no Laboratório de Virologia do Instituto Butantã sob orientação de Dalva Assunção Portari Mancini.

8. Hospital Geral do Buenos Aires - HGBA

Vinculo institucional

2005 - 2005 Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 16, Regime: Parcial Outras informações: Atividades Estágio em Alimentação Institucional

Projetos

Projetos de

2012 - 2012 O reaproveitamento de alimentos como uma prática para evitar o desperdício e promover a Educação Alimentar e Nutricional em Caxias - MA

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Situação: Colicidio Matureza: Frigetos de pesquisa Alunos envolvidos: Graduação (1); Integrantes: Lucillia Rabelo de Oliveira Torres (Responsável); ; Lázaro Renato dos Santos Andrade; Vanessa Magalhães da Silva; Aldaisa Pereira dos Santos

Revisor de periódico

1. Food Research International

2015 - Atual Regime: Parcial

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

- doi≥ SHINAGAWA, FERNANDA BRANCO; SANTANA, FERNANDA CARVALHO DE; TORRES, LUCILLIA RABELO OLIVEIRA; MANCINI-FILHO, JORGE Grape seed dil: a potential functional food?. Ciência e Tecnologia de Alimentos (Online). □CF , v.35, p.399-406, 2015.
- OLIVEIRA, L.R.; NEVES, J. A.; Silva, M. J. M. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISÍCO-QUÍMICA DO ÓLEO BRUTO DA AMÊNDOA DE BABAÇU (ORBIGNYA SPP) PRODUZIDO EM JOSÉ DE FREITAS-PI. Comunicata Scientiae (Online). , v.4, p.161 -167, 2014.
- NEVES, J. A.; SILVA, R. A.; OLIVEIRA, L.R.; BATISTA, R.D.S.R. DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE AFLATOXINAS EM CASTANHAS DE CAJU. Publicatio UEPG. Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias (Impresso). , v.15, p.39 44, 2009.

Artigos aceitos para publicação

- 1. TORRES, L.R.O.; SHINAGAWA, F. B.; SANTANA, F. C.; ARAUJO, E. S.; OROPEZA, M. V.; MANCINI-
 - Physicochemical and antioxidant properties of the pequi (Caryocar brasiliense Camb.) almond oil obtained by handmade and cold-pressed processes. International Food Research Journal., 2016.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

- 1. SHINAGAWA, F. B.; TORRES, L.R.O.; SANTANA, F. C.; MANCINI-FILHO, J. SHINAGAWA, F. B.; TOKRES, L.R.O.; SANTANA, F. C.; MANCINI-FILHO, J.

 Aumento da atividade de nezimas antioxidantes no tecido cerebral após o consumo de óleo de semente de
 uva por ratos In: X Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages (X BMCFB) V National
 Conference of National Institute of Science & Technology for Tropical Fruits, 2014, Aracaji.

 X Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages (X BMCFB) V National Conference of
 National Institute of Science & Technology for Tropical Fruits., 2014.
- 2. TORRES, L.R.O.; SANTANA, F. C.; SHINAGAWA, F. B.; ARAUJO, E. S.; LIMA, H. C.; MANCINI-FILHO, J. TORRES, L.R.O.; SANTANA, F. C.; SHINAGAWA, F. B.; ARAUJO, E. S.; LIMA, H. C.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação fisico-química e compostos bioativos de óleos da améndoa de pequi (Caryocar brasiliene Camb.) obtidos artesanalmente e por prensagem a frio In: X Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages (X BMCFB) V National Conference of National Institute of Science & Technology for Tropical Fruits, 2014, Aracajú.

 X Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages (X BMCFB)/ V National Conference of National Institute of Science & Technology for Tropical Fruits. , 2014.
- YOSHIME, L. T.; SILVA, A. M. O. E.; CARVALHO, E. B. T.; SHINAGAWA, F. B.; SANTANA, F. C.; MELO, ILLP; OLIVEIRA, L.R.; TORRES, R. P.; MANCINI-FILHO, J. Compostos bioativos: Influência sobre marcadores de estresse oxidativo e inflamação In: IX Simpósio lipídeos e saúde, São Paulo. IX Simpósio lipídeos e saúde., 2014.
- 4. SHINAGAWA, F. B.; YOSHIME, L. T.; SANTANA, F. C.; OLIVEIRA, L.R.; ARAUJO, E. S.; MANCINI-SHINAGAWA, F. B.; YOSHIME, L. I., SANTANA, T. O., SELELI, S., SANTANA, T. S., SELELI, S., SANTANA, T. S., SELELI, S., SANTANA, T. S., SELELI, S., SANTANA, S., SANTANA,
- 5. SHINAGAWA, F. B.; OLIVEIRA, L.R.; SANTANA, F. C.; MELO, I.L.P.; MANCINI-FILHO, J. Caracterização química do óleo de semente de uva (Vitis vinifera L) prensado à frio In: 12º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição SBAN, 2013, Foz do Iguaçu. Nutrire Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição SBAN., 2013. v.38.
- SANTANA, F. C.; SHINAGAWA, F. B.; OLIVEIRA, L.R.; REIS, S. L. R.; SILVA, A. M. O. E.; COSTA, A. M.; SANTANA, F. C., Onlivacawa, F. B., **ULIVEIRA, L.K.**, REIS, S. L. R., SILVA, A. M. D. E., CUSTA, A. M. MANCINI-FILHO, J. Influência das variáveis solvente, temperatura e tempo na extração de compostos fenólicos totais em sementes de maracujá gerada no processamento industrial In: 12° Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN, 2013, Foz do Iguaçu. Nutrire - Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN., 2013. v.38.
- OLIVEIRA, L.R.: SHINAGAWA, F. B.: SANTANA, F. C.: SILVA, A. M. O. E.: MANCINI-FILHO. J. Modulation of the lipid peroxidation and antioxidant enzymes by oils suplementation from pequi almond and palm in rats kidneys In: Antioxidants and redox process in health - Bilateral meeting Brazil Japan, 2013, São

Antioxidants and redox process in health 2013-Program and abstracts. . 2013.

SANTANA, F. C.; SHINAGAWA, F. B.; OLIVEIRA, L.R.; SILVA, A. M. O. E.; MARCELLINI, P.S.; MANCINI-

FILHO, J.

Optimization of extraction of phenolic compounds from passion fruit seed recovered from juice production residue using response surface methodology In: Antioxidants and redox process in health - Bilateral meeting Brazil Japan, 2013, São Paulo.

Antioxidants and redox process in health 2013-Program and abstracts. , 2013

ANDRADE, L. R. S.: OLIVEIRA, L.R.: SANTOS, A. P.: SILVA V. M.: SOUSA, E. R. Andrawici, L. N. S., Velivelink, L. R., Sarivis, A. F., Silvy, V. M., Sodon, E. R. .
Reaprovellamento de alimentos como uma prática para evitar o desperdício e promover a educação alimentar e nutricional em Caxias-MA In: VIII Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação da Rede Federal de Educação Profissional, Científica e Tecnológica, 2013, Salvador.
Anais do VIII Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação - CONNEPI., 2013.

10. OLIVEIRA, L.R.; SHINAGAWA, F. B.; SANTANA, F. C.; SILVA, A. M. O. E.: MANCINI-FILHO. J Suplementação dos ácidos graxos de oleos de pequi, palma e oliva sobre a peroxidação lipídica e enzima antioxidantes em figados de ratos In: 12º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN, 2013, Foz do Iguaçu.

Nutrire - Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN, , 2013, v.38.

11. MELO, I.L.P.; CARVALHO, E. B. T.; OLIVEIRA, L.R.; SILVA, A. M. O. E.; MANCINI-FILHO, J CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS É AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DA SÉMENTE DE ROMÃ In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - 45 anos de Ciência e

Tecnologia de Alimentos no Brasil. , 2012. SANTANA, F. C.; SHINAGAWA, F. B.; OLIVEIRA, L.R.; MELO, I.L.P.; MANCINI-FILHO, J.

Estabilidade Oxidativa de diferentes deos vegetais e blends com deo de soja In: Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos, 2012, Campinas.

CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - 45 anos de Ciência e Tecnologia de Alimentos no Brasil. , 2012.

13. OLIVEIRA, L.R.; SHINAGAWA, F. B.; SANTANA, F. C.; SILVA, A. M. O. E.; MANCINI-FILHO, J. Supplementation with dietary vegetable oils does not affect lipid peroxidation and biochemical p rat plasma. In: XVI Congresso Latino Americano de Nutrición - SLAN, 2012, Habana. Anais do XVI Congresso LatinoAmericano de Nutrición - SLAN. 2, 2012. on and biochemical parameters in

OLIVEIRA, L.R.; SHINAGAWA, F. B.; SILVA, A. M. O. E.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant activity of pequi almond oil obtained by two different methods: handmade and cold pressing In: XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, 2011, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São paulo: , 2011. v.47.

SHINAGAWA, F. B.; OLIVEIRA, L.R.; SILVA, A. M. O. E.; MANCINI-FILHO, J Estudo dos compostos bioativos por espectrofotometria em óleo de semente de uva prensado à frio In: 9 Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos, 2011, Campinas. 9 Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos., 2011.

SHINAGAWA, F. B.: OLIVEIRA, L.R.: SANTANA, F. C.: MANCINI-FILHO. J Total antioxidant capacity and total phenolics content of grape seed cold pressed oil In: XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, 2011, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Science., 2011. v.47.

MELO, I.L.P.; CARVALHO, E. B. T.; **OLIVEIRA**, L.R.; SILVA, A. M. O. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da estabilidade do óleo da semente de romã (Punica granatum L.) In: Il Simpósio em ciência e tecnologia de alimentos. I Congresso do instituto nacional de frutos tropicais, 2010, Aracajú. Il Simpósio em ciência e tecnologia de alimentos. I Congresso do instituto nacional de frutos

OLIVEIRA, L.R.; SILVA, A. M. O. E.; MELO, I.L.P.; CARVALHO, E. B. T.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação dos compostos fenólicos e das propriedades antioxidantes da polpa do pequi in natura (Caryocar coriaceum Witmm.) In: II Simpósio em ciência e tecnologia de alimentos. I Congresso do instituto nacional de frutos tropicais, 2010, Aracajú. Il Simpósio em ciência e tecnologia de alimentos. I Congresso do instituto nacional de frutos tropicais. , 2010.

OLIVEIRA, L.R.; TACIRO, G.; SILVA, A. M. O. E.; MELO, I.L.P.; MANCINI-FILHO, J. Phenolic compounds evaluation and antioxidant activity of the different pequi (Caryocar coriaceum Witmm) varieties In: XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2010, São Paulo.

XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. , 2010. OLIVEIRA, L.R.; TACIRO, G.; SILVA, A. M. O. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação das propriedades antiloxidantes e compostos fenólicos da polpa processada do pequi (Caryocar brasiliense Camb) In: 10º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN, 2009, São Paulo/SP.

Anais do 10º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN.

OLIVEIRA, L.R.; TACIRO, G.; SILVA, A. M. O. E.; MANCINI-FILHO, J. Determination of antioxidant activity and phenolic compounds present in the pulp processed of pequi (Caryocar brasiliense Camb) In: XIV Semana Farmacéutica de Ciência e Tecnologia; XLIV Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica; Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacéuticas, 2009, São Paulo.

XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. , 2009.

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

TORRES, L.R.O.; COELHO, F. O. A. M.; FERNANDES, M. A. C. Participação em banca de Adriene Kelly Nunes Fernandes Seixas. Relação cintura/estatura como preditor de risc cardiovascular elevado em policiais militares lotado no 2º batalhão Major Osmar na Cidade de Parnaíba - Piauí, 2016 (Nutrição) Faculdade do Piauí

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 12/06/2016 às 09:01:30.