



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO
UNIVERSIDADE DO PORTO

Contribuição do consumo de carne reestruturada com Glucomanano e

Glucomanano/Espirulina para o risco de doença cardiovascular.

Contribution of restructured meat with Glucomanan and

Glucomanan/Spirulin consumption on risk of cardiovascular disease.

Cátia Sofia Fonseca Matos

Orientado por: Professor Dr. Francisco J. Sánchez Muniz –

Universidade Complutense de Madrid, Espanha

Tipo de documento: Trabalho de Investigação

Ciclo de estudos: 1.º Ciclo em Ciências da Nutrição

Instituição académica: Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da

Universidade do Porto

Porto, 2012

Agradecimentos

Agradeço ao programa erasmus a possibilidade de mobilidade internacional e ao projecto espanhol AGL2011-29644-C02-02 e Consolider Ingenio 2010 # CSD2007-00016 o financiamento à investigação desenvolvida. Agradeço ao grupo de investigação liderado por Professor Dr. Francisco J. Sánchez Muniz, a aceitação e inclusão no seu grupo de investigação. Aos meus colegas de laboratório, Laura, Miguel, Alba, Maria Angeles e Patrícia o companheirismo, partilha de conhecimento e a amizade. À Professora Dra Sara Bastida, Professora Dra Juana Benedí, Professora Dra Olívia Pinho toda a ajuda, disponibilidade e interesse demonstrado no meu trabalho. Em particular ao Professor Dr. Francisco J. Sánchez Muniz, todo o conhecimento que me transmitiu e humildade com que o partilha, o incentivo para a busca de explicações válidas e o estímulo para a investigação.

A todos, muito obrigada!

Agradecimientos

Agradezco al programa Erasmus la posibilidad de movilidad internacional y al proyecto español AGL2011-29644-C02-02, proyecto Consolider Ingenio 2010 # CSD2007-00016, los fondos para la investigación desarrollada. Gracias al grupo de investigación dirigido por el profesor Dr. Francisco J. Sánchez Muniz, por la aceptación y la inclusión en su equipo de investigación. A mis compañeros de laboratorio, Laura, Miguel, Alba, María Ángeles y Patricia, el compañerismo, compartiendo de conocimiento y la amistad. Gracias a las professoras Dras Sara Bastida, Juana Benedí y Olívia Pinho toda la ayuda, disponibilidad y el interés en mi trabajo. En particular mi agradecimiento, al profesor Dr. Francisco J. Sánchez Muniz, por todo el conocimiento que me dio y la humildad con que lo hace, el incentivo para buscar explicaciones válidas y de estímulo para la investigación.

¡A todos, muchas gracias!

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iv
Introdução	1
Objectivos.....	2
Material e Métodos	2
Resultados	4
Discussão e Conclusões	8
Referências Bibliográficas	12

Resumo

A carne reestruturada com Glucomanano e Glucomanano/Espirulina é um potencial produto funcional. Neste trabalho estudaram-se os efeitos do seu consumo, em ratos Zucker Fa/Fa ao nível da colesterolemia, glucemia, peso final, alterações antioxidantes e perfil lipídico hepático. Seis grupos de seis ratos foram alimentados durante sete semanas com 85% de dieta AIN-93M e 15% de carne reestruturada controlo (C), Glucomanano (G) e Glucomanano/Espirulina (GS) sem colesterol e dietas homologas com adição de 2% colesterol e 0.4% ácido cólico, dietas HC, HG e HGS respectivamente. A adição de Glucomanano à dieta promoveu uma redução significativa da colesterolemia ($p < 0.05$). O índice redox (IR) não sofreu alterações nas diferentes dietas, verificando-se um decréscimo significativo ($p < 0.05$) de glutatião oxidado (GSSG) na dieta HGS vs GS. A peroxidação lipídica avaliada como malondialdeído (MDA), apareceu em menor quantidade ($p < 0.05$) nas dietas com adição de agentes colesterolémicos HG e HGS em homogeneizados de fígado e HGS no plasma. A diminuição de ácido araquidónico (AA), docosahexaenóico (DHA) e dos quocientes araquidónico/linoléico (AA/AL) e DHA/alfa-linolénico (DHA/LN) dos grupos HC HG e HGS vs C, G e GS respectivamente, sugerem uma inibição do sistema delta-6-desaturase/elongase no fígado. Concluimos que a adição de Glucomanano à carne reestruturada deu origem a um produto funcional, com capacidade de reduzir o efeito hipercolesterolemizante da dieta, assim como a mistura Glucomanano/Espirulina também teve um efeito efectivo.

Palavras-Chave: Doença Cardiovascular, Glucomanano, Espirulina, stress oxidativo e Colesterol.

Abstract

Restructured meats containing Glucomannan and Glucomannan/Spirulin are potential functional foods. In this study we investigated the effects of their consumption in Zucker Fa/Fa rats upon the level of cholesterol, glycemic, final body weight, antioxidant status and liver lipid profile. Six groups of six rats were fed for seven weeks with 85% AIN-93M and 15% of restructured meat control (C), Glucomannan (G) and Glucomannan/Spirulina (GS) without cholesterol agent and homologous diets with 2% cholesterol and 0.4% cholic acid HC, HGS and HG diets respectively. The addition of the Glucomannan to meats promoted a significant reduction of cholesterol ($p < 0.05$) that was even more profound under the glucommannan/spirulina mix. A significant decrease ($p < 0.05$) in the oxidized glutathione (GSSG) was found in HGS vs GS rats, although the Redox index did not change in the different groups. The lipid peroxidation evaluated as malondialdehyde (MDA) decreased ($p < 0.05$) in liver homogenates of HGS and HG rats and in plasma of HGS animals. The percentage of arachidonic acid (AA), docosahexaenoic acid (DHA), the arachidonic acid/linoleic acid (AA/LA) and DHA/alpha-linolenic (DHA/LN) ratios decreased in HC, HG, and HGS vs C, G, and GS fat liver, respectively, suggesting inhibition of the delta-6-desaturase/elongase and a lower oxidant status in the liver of the hypercholesterolemic rats. In conclusion, glucomannan added to restructured pork transformed it in a functional food that reduced the hypercholesterolemic effect of diet like the mix glucommannan/spirulin.

Keywords: Cardiovascular Disease, Glucomannan, Spirulin, oxidative stress and Cholesterol.

Introdução

As Doenças Cardiovasculares (DCV) são a principal causa de incapacidade e morte prematura em todo o mundo e Portugal [1]. Têm uma etiologia multifactorial onde a adopção de um estilo de vida saudável, em particular uma dieta cardiosaudável é considerada ponto essencial para sua prevenção e tratamento [2].

Os produtos de origem animal estão cada vez mais presentes à mesa dos Portugueses, e consequentemente as gorduras saturadas devido ao aumento da disponibilidade para consumo do grupo “Carne, Pescado e Ovos” [3].

A carne e produtos derivados de carne são essenciais para uma dieta equilibrada e óptima, concentram um elevado número de nutrientes tais como proteínas, minerais, gordura e vitaminas [4]. Se outrora a carne era sinónimo de saúde e prosperidade, ao longo das últimas décadas é apontada como um alimento associado a DCV [4,5]. Esta associação deve-se ao seu teor em ácidos gordos saturados (AGS), [4,5] que incrementam os níveis de Lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e risco DCV [6,7].

A tecnologia alimentar tem vindo a introduzir alterações qualitativas e/ou quantitativas na carne ou derivados da carne, para criar novos produtos funcionais [8] capazes de exercer um efeito benéfico sobre uma ou mais funções selectivas do organismo, podendo melhorar a saúde e bem estar, reduzir o risco de doença ou ambas as coisas [4]. Entre os possíveis ingredientes encontra-se a *Spirulina platensis*, uma micro-alga rica em minerais, compostos antioxidantes e biliproteína com actividade hipocolesterolémica [9]. Outro possível ingrediente é o Konjac Glucomanano (KGM), um polissacarídeo extraído do tubérculo de *Amorphophallus konjac* [10]. KGM é sugerido por alguns estudos para o tratamento de obesidade [11], deslipidemia relacionada à obesidade [12-14], diabetes [15-17], promoção da saciedade [18], efeito pré-biótico [19-24], imunomodulador [25,26], antioxidante [27] e efeito hipocolesterolémico [28,29].

A hipercolesterolemia está associada ao aumento de stress oxidativo em animais e humanos [8,30]. Os radicais livres originados pelo stress oxidativo são capazes de causar danos celulares e tecidulares, que podem resultar em morbidades tais como o cancro e DCV [27]. Os ratos Zucker Fa/Fa são um modelo animal com predisposição para desenvolver obesidade e síndrome metabólico, são muito sensíveis a dietas hipercalóricas e hiperlipídicas [31,32], podendo desenvolver hipercolesterolemia. Sabe-se que as alterações do perfil lipídico e oxidação de lipoproteínas aumenta o risco de DCV [33]. Deste modo, o aumento do consumo de uma dieta rica em antioxidantes poderá reduzir a incidência de DCV e outras doenças degenerativas. Sánchez-Muniz et. al [33] testaram os efeitos do consumo de carnes reestruturadas com algas (Nori e Wakame) de ratos Wistar, sujeitos a uma dieta hipercolesterolemiantes verificaram alterações ao nível da expressão e actividade de enzimas antioxidantes [33]. Neste trabalho testamos a hipótese de dietas com carne reestruturada com Glucomanano e Glucomanano/Espirulina serem capazes de melhorar a colesterolemia e o status antioxidante em ratos Zucker Fa/Fa.

Objectivos

Determinar o impacto de uma dieta com carne reestruturada enriquecida com Glucomanano ou Glucomamano/Espirulina ao nível da colesterolemia, glucemia, peso final, stress oxidativo e perfil lipídico hepático em ratos Zucker Fa/Fa.

Material e Métodos

Preparação da Carne Reestruturada: A carne reestruturada teve preparação no Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos e Nutrição (ICTAN, CSIC, Madrid), [34].

Amostra: Trinta e seis ratos Zucker Fa/Fa (Harlan Laboratories Models, SL, Barcelona-Spain), com aproximadamente 90g, foram mantidos durante sete semanas em células individuais a uma temperatura $22.3 \pm 1.8^{\circ}\text{C}$, em ciclos de 12 horas de escuridão leve e registo de evolução

de peso/quantidade de comida consumida de dois em dois dias. O estudo foi aprovado pelo Comité de Ciência e Tecnologia de Espanha (projecto AGL2011-29644-C02-02 e Consolider Ingenio 2010 # CSD2007-00016) e pelo Comité de Ética da Universidade Complutense de Madrid (Espanha). Após as sete semanas, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de sódio pentobarbital (45mg/kg de peso corporal) seguida de eutanásia por extracção de sangue na aorta descendente com uma seringa.

Dieta: A amostra de trinta e seis ratos Zucker Fa/Fa, divididos em seis grupos de igual número, foram alimentados com dietas distintas entre grupos, tendo em comum 85% de dieta AIN-93M (AIN-93M purified rodent diet; Dyets, Inc., Bethlehem, PA, USA) e 15% de carne reestruturada variável. Dieta C, 15% carne reestruturada controlo; Dieta G, 15% carne reestruturada com glucomanano; Dieta SG, 15% carne reestruturada com glucomano/espirulina; Dieta HC, constituída por dieta C + 2% colesterol e 0.4% ácido cólico; Dieta HG, constituída por dieta G + 2% colesterol e 0.4% ácido cólico; Dieta HSG, constituída por dieta SG + 2% colesterol e 0.4% ácido cólico.

Determinação da Peroxidação Lipídica: A peroxidação lipídica foi efectuada pelo princípio das substâncias reactivas ao ácido Tiobarbitúrico (TBA), de acordo com o método Mihara e Uchiyama [36].

Determinação do Índice Redox (IR): O IR foi determinado pela razão entre glutatião reduzido (GSH) e a totalidade de Glutatião Oxidado (GSSG) e GSH. A determinação de GSH e GSSG foi realizada seguindo o método Hissin e Hilf [35], usando uma sonda fluorescente o O-ftaldialdeído (OPT).

Determinação de ácidos gordos no Fígado: Para a determinação de ácidos gordos no fígado, foi realizada inicialmente a extracção da gordura de acordo com o método de Folch et. al [37]. Posterior caracterização do perfil de ácidos gordos, sob a forma de ésteres metílicos em cromatografia gasosa capilar, de acordo com o procedimento seguido por Carrapiso et. al [38].

A Caracterização realizada no Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos (ICTAL) da Universidade de León, Espanha.

Determinação de colesterol total em homogeneizado de fígado, colesterol total e glucose no plasma: Em amostras de gordura extraída de homogeneizados de fígado, efectuou-se a determinação de colesterol total através do kit colesterol CHODPOD Líquido da SPINREACT (San Esteve de Bas, Girona, Espanha). No plasma determinou-se o colesterol total pelo mesmo método usado em homogeneizados de fígado e glucose através do kit Glucose da SPINREACT (San Esteve de Bas, Girona, Espanha).

Estudo estatístico: A análise estatística foi realizada através da versão IBM SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Os resultados são expressos em valores médios e desvios normais. O efeito da dieta foi verificado por ANOVA de dois factores (dieta e colesterol) para estudar possíveis interações. Posteriormente, avaliou-se o efeito da dieta (C vs G vs GS e HC vs HG vs HGS) mediante ANOVA para um factor, seguido do teste de Bonferroni, enquanto o efeito de colesterol foi analisado pelo teste *t* de Student. Os resultados foram considerados significativos para $p < 0.05$.

Resultados

A **tabela 1** mostra que o peso final foi afectado pelos agentes hipercolesterolémicos, decrescendo nos grupos HC, HG, HGS vs C, G, GS ($p < 0.01$; $p < 0.001$; $p < 0.01$). A percentagem de gordura extraída de fígado aumenta significativamente ($p < 0.05$) nos grupos HG, HGS vs G, GS. O colesterol total hepático aumentou sem resultado significativo. O colesterol total plasmático aumentou nos grupos HC e HG vs C e G ($p < 0.01$; $p < 0.001$), no entanto o mesmo não aconteceu em HGS vs GS. Os grupos HG e HGS registaram colesterolemias inferiores ao grupo HC. A glicemia sofre uma diminuição significativa ($p < 0.01$) no grupo HC vs C.

Tabela 1. Peso final, percentagem de gordura extraída de fígado, colesterol total plasmático/hepático e glicemia.

Dieta	Adição de colesterol	C/HC	Desvio	G/HG	Desvio	GS/HGS	Desvio	ANOVA		
								Dieta	Col.	Inter.
Peso final (gramas)	Não	398.38	30.43	436.27	38.28	465.35	9.90	<0.001	<0.001	0.711
	Sim	333.75	25.45	**a 358.18	21.60	***a 369.10	45.86			
Gordura extraída de fígado (%)	Não	13.62	7.60	10.22	3.12	11.17	2.91	0.524	<0.001	0.136
	Sim	19.40	5.20	24.43	5.80	* 27.94	6.39			
Colesterol total/fígado (c)	Não	7.97	3.63	12.54	4.16	12.56	3.71	0.073	0.015	0.711
	Sim	12.99	4.27	15.54	4.33	19.31	6.31			
Colesterol total/plasma (d)	Não	170.53	37.89	167.85	15.29	183.08	33.66	<0.001	<0.001	<0.001
	Sim	990.59	324.70	**a 418.31	81.38	***b 236.58	139.30			
Glicemia (e)	Não	347.50	34.74	355.17	73.68	340.75	60.54	0.986	<0.001	0.834
	Sim	231.17	62.25	** 224.00	142.69	249.17	86.46			

Valores médios (n=5) que dentro da mesma linha são significativamente diferentes (P<0.05; teste Bonferroni): a, b.

Valores que dentro da mesma coluna para o mesmo parâmetro, com ou sem adição de colesterol são significativamente diferentes: *P<0.05, **P<0.01 e ***P<0.001.

(c): mg de colesterol/g de fígado; (d):mg colesterol/dL; (e): mg glucose/dL.

Os resultados da **tabela 2** evidenciam ao nível intestinal uma subida (p<0.05) de GSSG no grupo HGS vs GS e um decréscimo (p<0.05) do mesmo parâmetro em GS vs G e C.

Tabela 2. Efeito de uma dieta de carne reestruturada com Glucomanano ou Glucomanano/Espirulina, com ou sem adição de colesterol no índice redox, GSH e GSSG em homogenizados de fígado, intestino e cérebro.

Dieta	Adição de colesterol	C/HC	G/HG	GS/HGS	ANOVA			
					Dieta	Col.	Inter.	
Fígado	GSH (c)	Não	0.60±0.25	0.61±0.22	0.52±0.19	0.984	0.138	0.830
		Sim	0.50±0.14	0.47±0.12	0.52±0.18			
	GSSG(d)	Não	0.63±0.22	0.55±0.03	0.62±0.18	0.697	0.274	0.875
		Sim	0.54±0.06	0.51±0.07	0.57±0.15			
	IR (e)	Não	0.48±0.09	0.51±0.10	0.45±0.06	0.903	0.53	0.817
		Sim	0.47±0.10	0.47±0.09	0.48±0.11			
Intestino	GSH (c)	Não	0.33±0.08	0.31±0.11	0.22±0.11	0.707	0.212	0.905
		Sim	0.34±0.27	0.35±0.14	0.32±0.14			
	GSSG(d)	Não	0,36±0.09	a 0.30±0.14	a 0.20±0.07	0.196	0.199	0.839
		Sim	0.37±0.25	0.32±0.06	0.30±0.04			
	IR (e)	Não	0.48±0.06	0.51±0.05	0.50±0.10	0.506	0.806	0.991
		Sim	0.46±0.09	0.50±0.08	0.50±0.10			
Cérebro	GSH (c)	Não	0.14±0.03	0.12±0.01	0.14±0.04	0.284	0.537	0.961
		Sim	0.14±0.01	0.13±0.02	0.15±0.04			
	GSSG(d)	Não	0.17±0.03	0.16±0.03	0.17±0.04	0.981	0.937	0.924
		Sim	0.17±0.02	0.18±0.08	0.17±0.05			
	IR (e)	Não	0.46±0.07	0.43±0.04	0.45±0.04	0.477	0.498	0.961
		Sim	0.46±0,05	0.44±0,09	0.47±0.04			

Valores (média ± desvio padrão; n=6) que dentro da mesma linha são significativamente diferentes (P<0.05; teste Bonferroni): a, b.

Valores que dentro da mesma coluna para o mesmo parâmetro, com ou sem adição de colesterol são significativamente diferentes: *P<0.05.

(c): µg GSH/mg tecido; (d): µg GSH/mg tecido; (e): GSH/(GSSG+GSH).

A peroxidação lipídica (**tabela 3**) revela um decréscimo ($p<0.05$) de MDA, nos grupos HC, HG, HGS vs C, G, GS em homogeneizados de fígado e no grupo HGS vs GS de plasma.

Tabela 3. Efeito de uma dieta de carne reestruturada com Glucomanano ou Glucomanano/Espirulina, com ou sem adição de colesterol na peroxidação lipídica (μg MDA/mg proteína).

Dieta	Adição de Colesterol	C/HC	G/HG	GS/HGS	ANOVA		
					Dieta	Col.	Inter.
Fígado	Não	18.39 \pm 7.90	20.22 \pm 5.31	18.31 \pm 5.63	0.983	<0.001	0.965
	Sim	9.74 \pm 4.24 *	9.16 \pm 4.40 *	8.51 \pm 4.32 *			
Cérebro	Não	187.56 \pm 80.01	141.93 \pm 58.67	138.42 \pm 58.82	0.53	0.321	0.966
	Sim	156.11 \pm 69.47	130.98 \pm 37.65	128.83 \pm 65.51			
Intestino	Não	1.80 \pm 1.42	2.15 \pm 3.48	0.83 \pm 0.97	0.62	0.48	0.643
	Sim	1.93 \pm 3.10	1.34 \pm 1.29	1.48 \pm 1.10			
Plasma	Não	197.60 \pm 74.20	186.14 \pm 51.72	205.53 \pm 30.41	0.53	0.215	0.112
	Sim	186.10 \pm 101.99	140.20 \pm 77.30	90.00 \pm 36.53 *			

Valores (média \pm desvio padrão; n=5) que dentro da mesma coluna para o mesmo parâmetro com ou sem adição de colesterol são significativamente diferentes: * $P<0.05$.

O perfil de ácidos gordos hepáticos na **tabela 4.** revela uma diminuição ($p<0.05$) de C16:0 em HC,HGS vs C,GS sendo que aumenta ($p<0.05$) em HG vs HC, HGS; Diminuição ($p<0.01$) de C18:0 em HGS vs GS com aumento em GS vs C e G; Aumento ($p<0.01$; $p<0.001$; $p<0.01$) de C18:1n9 em HC,HG e HGS vs C,G e HGS com diminuição em GS vs C,G; C18:2n6 diminui ($p<0.05$) nos grupos G e GS vs C; C18:3n6 aumenta em HG vs G ($p<0.01$); C20:1 ($p<0.05$) aumenta em HC vs C; Aumento ($p<0.01$; $p<0.05$) de C18:3n3 em HC, HG vs C, G com diminuição ($p<0.05$) em HG vs HC, HGS; Diminuição ($p<0.05$) de C20:3n6 em G,GS vs C e HGS vs HG, HC; C20:4n6 diminui ($p<0.05$; $p<0.01$; $p<0.001$) em HC, HG e HGS e entre HGS, HG vs HC ($p<0.05$); C20:5n3 diminuição ($p<0.05$; $p<0.01$) em HC,HG vs C,G e diminuição ($p<0.05$) entre HGS vs HG,HC; Diminuição ($p<0.01$; $p<0.01$; $p<0.05$) de C22:6n3 em HC, HG, HGS vs C, G, GS e em ($p<0.05$) HGS vs HG, HC.

Tabela 4. Perfil de ácidos gordos (g/100g de ésteres metílicos) presentes em homogeneizado de fígado.

Dieta	Adição de Colesterol	C/HC	Desvio	G/HG	Desvio	GS/HGS	Desvio	ANOVA		
								Dieta	Col.	Inter.
C14:0	Não	1.32	0.53	1.51	0.39	1.73	0.67	0.414	0.283	0.705
	Sim	1.22	0.08	1.44	0.20	1.34	0.30			
C16:0	Não	16.31	1.31	19.05	4.60	17.40	3.22	0.059	0.010	0.748
	Sim	12.45	2.38	*a 16.91	3.07	b 13.17	1.50			
C16:1	Não	20.40	0.25	19.01	3.27	20.78	1.29	0.574	0.130	0.875
	Sim	22.67	2.06	22.48	2.35	23.30	3.66			
C18:0	Não	7.10	1.29	a 7.07	1.19	a 9.92	1.68	0.026	0.037	0.248
	Sim	6.32	0.73	6.67	0.85	7.27	2.11			
C18:1n9	Não	31.96	2.03	ab 32.61	1.64	a 29.26	2.40	0.942	<0.001	0.088
	Sim	38.50	0.59	** 38.62	0.74	*** 41.12	5.60			
C18:2n6	Não	6.26	1.31	a 4.90	0.35	b 4.89	0.44	0.025	0.249	0.741
	Sim	6.29	0.25	5.45	0.84	5.51	1.16			
C18:3n6	Não	0.21	0.04	0.13	0.04	** 0.22	0.08	0.515	0.550	0.565
	Sim	0.17	0.08	0.21	0.07	0.25	0.22			
C20:1	Não	0.23	0.10	0.19	0.06	0.26	0.22	0.433	0.500	0.860
	Sim	0.39	0.10	* 0.29	0.15	0.44	0.29			
C18:3n3	Não	0.27	0.05	0.21	0.03	* 0.26	0.17	0.041	0.020	0.429
	Sim	0.41	0.05	**a 0.28	0.05	b 0.46	0.11			
C20:3n6	Não	0.62	0,12	a 0,36	0.14	b 0.36	0.14	0.030	0.216	0.498
	Sim	0.64	0,16	a 0,52	0.11	ab 0.39	0.11			
C20:4n6	Não	9.78	0.76	9.56	1.17	9.25	0.76	0.001	<0.001	0.010
	Sim	7.97	0.84	*a 5.16	0.24	**b 5.02	0.94			
C20:5n3	Não	2.11	0.82	2.23	0.49	2.75	0.83	0.785	<0.001	0.098
	Sim	1.06	0.22	*a 0.61	0.37	**ab 0.42	0.29			
C22:6n3	Não	3.45	0.40	3.17	0.84	2.92	0.91	0.175	<0.001	0.886
	Sim	1.91	0.44	**a 1.35	0.22	**a 1.32	0.42			

Valores médios (n=4) que dentro da mesma linha são significativamente diferentes (P<0.05; teste Bonferroni): a, b.

Valores que dentro da mesma coluna para o mesmo parâmetro, com ou sem adição de colesterol são significativamente diferentes: *P<0.05, **P<0.01 e ***P<0.001.

Na **tabela 5** evidencia-se uma diminuição significativa ($p<0.05$) de AGS nos grupos HC, HGS vs C, GS, sendo que, essa quantidade é significativamente maior ($p<0.05$) em HG e HGS vs HC. Aumento marcado de AGM em HC, HG, HGS vs C, G, GS ($p<0.001$; $p<0.01$; $p<0.001$), entre os quais existe diferença entre o grupo ($p<0.05$) HC vs HGS e HG. Diminuição de AGP bastante acentuada ($p<0.001$; $p<0.01$) em HC, HG, HGS vs C, G e GS. O quociente

C18:1n9/C18:0 sobe em HG vs G ($p<0.05$), C22:6n3/C18:3n3 decresce ($p<0.01$; $p<0.001$; $p<0.001$) acentuadamente em HC, HG, HGS vs C, G, GS e C20:4n6/18:2n6 diminui ($p<0.001$; $p<0.001$) em HG, HGS vs G, GS, sendo neste caso HG e HGS diferentes de HC ($p<0.05$).

Tabela 5. Quantidades de ácidos gordos saturados (AGS), monossaturados (AGM), polissaturados (AGP), C18:1n9/C18:0, C22:6n3/C18:3n3, C20:4n6/18:2n6 presentes em gordura extraída de homogeneizados de fígado .

Dieta	Adição de Colesterol	C/HG	Desvio	G/HG	Desvio	GS/HGS	Desvio	ANOVA		
								Dieta	Col.	Inter.
AGS	Não	24.72	1.53	27.63	4.35	29.05	3.67	0.031	<0.001	0.289
	Sim	19.99	2.18	*a	25.02	2.59	b			
AGM	Não	52.58	1.85	51.81	2.66	50.30	2.57	0.720	<0.001	0.061
	Sim	61.56	2.49	***a	61.39	2.23	**b			
AGP	Não	22.70	0.69	20.55	2.35	20.65	2.83	0.003	<0.001	0.279
	Sim	18.45	0.92	***	13.59	0.56	***			
C18:1n9/C18:0	Não	4.66	1.11	4.73	0.98	3.04	0.73	0.209	<0.001	0.216
	Sim	6.16	0.73		5.86	0.82	*			
C22:6n3/C18:3n3	Não	12.99	2.91	15.21	2.27	12.47	3.43	0.126	<0.001	0.700
	Sim	4.73	1.52	**	5.05	1.89	***			
C20:4n6/18:2n6	Não	1.62	0.42	1.97	0.32	1.90	0.22	0.905	<0.001	0.030
	Sim	1.27	0.17	a	0.96	0.15	***b			

Valores médios percentuais (n=4) que dentro da mesma linha são significativamente diferentes ($P<0,05$; teste Bonferroni): a, b. Valores que dentro da mesma coluna para o mesmo parâmetro, com ou sem adição de colesterol são significativamente diferentes : * $P<0,05$, ** $P<0,01$ e *** $P<0,001$.

Discussão e Conclusões

O presente estudo descreve a influência de uma dieta de carne reestruturada com glucomanano ou glucomanano/espirlina, com ou sem agente hipercolesterolémico ao nível do colesterol plasmático/hepático, glucemia, peso final e stress oxidativo em diferentes órgãos de modelos ratos Zucker Fa/Fa.

Neste estudo todos os grupos apresentaram pesos finais muito elevados, mesmo que mais baixos nos grupos sujeitos a dietas enriquecidas com colesterol. Estudos envolvendo ratos Zucker Fa/Fa, mostram que uma dieta rica em gordura e AGS, são capazes de induzir obesidade, hipercolesterolemia e diabetes [39,40]. Relativamente ao peso final a inclusão de colesterol nas dietas (HC, HG e HGS) teve um efeito negativo. Beynen et al [49] verificaram

que os ratos que recebiam dietas enriquecidas com colesterol apresentavam menor ganho de peso, tal como neste estudo.

Ao contrário do peso final, a percentagem de gordura extraída de homogeneizados de fígado, foi maior nos grupos sujeitos a agentes hipercolesterolémicos (HG, HGS vs G, GS), assim como a quantidade de colesterol total hepático foi maior nesses mesmos grupos, embora com resultados não significativos (**tabela 1**). Viejo et al [46] também encontraram um incremento de colesterol (sob a forma esterificada) e triglicéridos hepáticos em ratos hipercolesterolémicos.

De acordo com Sánchez-Muniz e Bastida [41] uma colesterolemia de 100mg/dL (2,58mmol/L) pode ser considerada ponto de corte para hipercolesterolemia em ratos. O grupo C apresenta uma hipercolesterolemia, com 100% dos ratos com níveis de colesterol ≥ 100 mg/dL (**tabela 1**). Os ratos HC apresentam uma grave hipercolesterolemia com 100% dos ratos com níveis de colesterol ≥ 666 mg/dL (**tabela 1**), efeito que se reduz marcadamente em HG e HGS. O mecanismo mais provável de acção de glucomanano, parece estar relacionado com a retenção de gordura por adsorção e ou apreensão de sais biliares, contribuindo para a diminuição dos efeitos das dietas hiperlipídicas [28,42]. Neste estudo a Espirulina induz efeito extra ao nível dos lípidos plasmáticos mesmo quando os resultados não são significativos em HGS vs GS. O seu conteúdo e tipo de fibra em conjunto com outros componentes (ex. minerais) produziu um efeito extra-hipocolesterolemizante. Apenas 3 g de Espirulina (≈ 1.0 g de fibra, 36 mg ω -3)/Kg foram adicionadas às dietas GS e HGS, quantidade relativamente pequena, incapaz de induzir alterações significativas nos níveis de lipoproteínas [43].

No presente estudo, todos os ratos que não consumiram dietas enriquecidas com colesterol converteram-se em diabéticos (**tabela 1**), o que contrastou com os grupos que receberam colesterol. Para os grupos que receberam colesterol, os níveis de glicemia foram

sensivelmente menores sendo que, alguns desses ratos registaram glicemias inferiores 120mg/dL, deixando de ser diabéticos.

Ao nível antioxidante os resultados da **tabela 2** quando expressados em $\mu\text{mol/g}$, mostram níveis de GSH três vezes menores e níveis de GSSG três vezes maiores, quando comparados com GSH e GSSG encontrados por Bocanegra et al [48] em ratos Wistar controlo. Também o índice redox é muito mais baixo em ratos C (0.41) quando comparado com Schultz et al [8] em ratos Wistar com dietas mais insaturadas e sem colesterol (0.74). Todo o exposto sugere que os ratos Zucker Fa/Fa, têm predisposição genética para desenvolver diabetes, dislipidemias e índices redox mais baixos. O que se reflete numa defesa antioxidante mais deficiente, apesar de estarem sujeitos a uma dieta mais saturada. Já foi anteriormente comentado que os ratos Zucker Fa/Fa alimentados com dietas com/sem colesterol neste estudo, desenvolveram na sua maioria diabetes (**tabela 1**). Numa situação de diabetes a glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) está inibida, conseqüentemente todo o mecanismo de defesa do organismo fica comprometido, e menor quantidade de co-factor enzimático NADPH é formado [44]. Este co-factor é essencial para a actividade de o glutatião regenerar GSH, deste modo, o índice redox (GSH/total) estará diminuído por diminuição de GSH, o pode explicar a diferença de índice redox entre o presente estudo e Schultz et al [8]. A inclusão de glucomanano/espirlina (GS) reduz significativamente os níveis de GSSG no intestino, no entanto este efeito desaparece com a introdução de colesterol na dieta, para o qual desconhecemos quais os mecanismos implícitos. No fígado não se observou qualquer efeito, indicando que não existe uma relação clara entre MDA e GSSG ou IR. Nos grupos que consumiram colesterol, o IR, GSH e GSSG não sofreram alterações relativamente às quantidades basais sem colesterol. Estes resultados parecem contradizer o anteriormente exposto, no entanto, desconhecemos o motivo pelo qual estes resultados aparecem. Em animais hipercolesterolémicos Schultz et al [8], verificaram uma redução da expressão

genética de enzimas antioxidantes, como por exemplo, glutatíon redutase, superóxido dismutase (SOD) e a catalase. Esta redução poderia refletir-se num aumento de stress oxidativo, no entanto é compensada pela redução dos níveis de glicemia, explicando porque não se verificaram alterações de índice redox nos tecidos.

O malondialdeído (MDA) é um biomarcador extensivamente utilizado para avaliar o stress oxidativo [45]. A quantidade de MDA presente em homogeneizados de fígado, cérebro, intestino e plasma (**tabela 3**) não diferiu entre os grupos C, G e GS ou entre HC, HG e HGS. No fígado e no plasma verificou-se que os animais hipercolesterolémicos registaram menor peroxidação lipídica. Para estes casos, seria de esperar um aumento de MDA e, portanto, maior stress oxidativo nas dietas com agente hipercolesterolémico, no entanto os resultados mostram paradoxalmente um efeito contrário.

Tendo em conta que numa situação de diabetes, a peroxidação lipídica plasmática está aumentada [44] e ao referido anteriormente, a redução do estado diabético apresentado nos grupos HC, HG e HGS pode explicar parcialmente a menor oxidação encontrada nestes grupos. Na tentativa de encontrar outra explicação para os resultados experimentais obtidos, efectuou-se o estudo do perfil de ácidos gordos hepáticos. Desse estudo é notório que os ratos C apresentam um incremento da percentual de ácido oleico no fígado, quando comparados com ratos com colesterol < 100mg/dL de Viejo et al [46]. Os grupos G e GS tendem a apresentaram menos AGP e AGP n-3 que o grupo C (**tabela 5**), possivelmente devido ao parcial bloqueio que glucomanano realiza sobre a absorção da gordura total e ingestão de AGP essenciais. Também é evidente um enriquecimento de ácido oleico ($p < 0.01$) e AGM nos fígados dos grupos HC, HG, HGS vs C, G, GS (**tabela 4 e 5**). Viejo et. al. [46] encontraram um aumento de ácido oleico no fígado de ratos sujeitos a dietas enriquecidas com colesterol. Estes mesmos autores sugeriram que o esse aumento ocorria era sob a forma de oleato de colesterol, como mecanismo para diminuir o pool de colesterol livre

hepático, aumentar a actividade de receptores VLDL e LDL, e diminuir os níveis plasmáticos de VLDL e LDL, ambas lipoproteínas aterogénicas. Tendo em conta que os grupos HC, HG e HGS apresentam menos AA, DHA, AA/AL e DHA/LN que os grupos C, G e GS, o que sugere uma inibição do sistema $\Delta 6$ -desaturase/elongase no fígado, sistema enzimático limitante na transformação de ácido linoleico (AL) ou linolénico (LL) em AGP de cadeia mais longa [47]. Esta situação parece estar agravada nos animais que receberam glucomanano, onde a absorção de ácidos gordos essenciais, como já foi anteriormente referido parece estar inibida. Os AL e LL são menos oxidáveis que AA, eicosapentaenóico (EPA) ou DHA, o que pode explicar em parte a menor peroxidação hepática nos grupos que recebem colesterol na dieta.

Em conclusão podemos dizer que, a dieta C de carne reestruturada rica em energia e AGS induz obesidade, diabetes e dislipidemias. Efeito que não se alterou com a adição de glucomanano e/ou espirulina. Quando se adicionou colesterol à dieta, o glucomanano reduziu de um modo muito significativo o efeito hipercolesterolemiantes da dieta C, no entanto não contribuiu para reduzir a peroxidação lipídica plasmática ou hepática. A inclusão de espirulina em simultâneo com glucomanano potenciou os efeitos hipocolesterolemiantes e antioxidantes.

Referências Bibliográficas

1. World Health Organization. Prevention of cardiovascular disease: guidelines for assessment and management of total cardiovascular risk. 2007.
2. Nus M, Sánchez-Muniz FJ. [M^a Pilar Vaquero] Importancia de la interacción dieta-genética en la prevención cardiovascular. Genética, Nutrición y Enfermedad. Madrid : EDIMSA. Editores Médicos, S.A., 2008,127-144.
3. Instituto Nacional de Estatística. Balança Alimentar Portuguesa 2003-2008. 2010.
4. Jiménez-Colmenero F, Sánchez-Muniz FJ, Olmedilla-Alonso B. Design and development of meat-based functional foods with walnut: Technological, nutritional and health impact. Food Chem. 2010; (123):959-967.
5. Sánchez-Muniz FJ. Derivados cármicos funcionales. Estrategias y perspectivas. Nuevos Alimentos. Madrid:1ªedición. Fundación Española de Nutrición (FEN). 2005; 43-54.
6. European Society of Cardiology, European Atherosclerosis Society. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. Eur Heart J. 2011; (32):1769-1818.

7. Davidson MH, Hunninghake D, Maki KC, Kwiterovich PO, Kafonek S. Comparison of the effects of lean red meat vs lean white meat on serum lipid levels among free-living person with hipercholesterolemia. *Arch Inter Med.* 1999; (159):1331-1338.
8. Schultz AM, González-Torres L, Olivero-David R, Bastida S, Benedi J, Sánchez-Muniz FJ. Wakame and Nori in restructured meats included in cholesterol-enriched diets affect the antioxidant enzyme gene expressions and activities in Wistar rats. *Plant Foods Hum Nutr.*, 2010;(65):290-298.
9. Cheong S, Kim M, Sok D, Hwang S, Kim J, Kim H, Lee J, Kim Y, Kim M. Spirulina prevents atherosclerosis by reducing hypercholesterolemia in rabbits fed a high-cholesterol diet. *J Nutr Sci Vitaminol.*, 2010;(56):34-40.
10. Ratcliffe I, Williams PA, Viebke C, Meadows J. Physicochemical Characterization of Konjac Glucomannan. *Biomacromoles.* 2005;(6):1977-1986.
11. Kraemer WJ, Vingren JL, Silvestre R, Spiering BA, Hatfield DL, Ho JY, Fragala MS, Maresh CM, Volek JS. Effect of adding exercise to a diet containing glucomannan. *Metabol Clin Experim.*2007;(56):1149-1158.
12. Gallaher CM, Munion J, Hesslink R, Wise J, Gallaher DD. Cholesterol reduction by glucomannan and chitosan is mediated by changes in cholesterol absorption and bile acid and fat excretion in rats. *J Nutr*, 2000;(130): 2753-2759.
13. Keithley J, Swanson B. Glucomannan and obesity: a critical review. *Altern Therap in Health Med.* 2005;(11):30–34.
14. Vasques CAR, Rossetto S, Halmenschlager G, Linden R, Heckler E, Fernandez MSP, Alonso JLL. Evaluation of the pharmacotherapeutic efficacy of *Garcia cambogia* plus *Amorphophallus konjac* for the treatment of obesity. *Phytotherapy Research*, 2008;(22):1135–1140.
15. Vuksan V, Jenkins DJA, Spadafora P, Sievenpiper JL, Owen R, Vidgen E, Brighenti F, Josse R, Leiter LA, Thompson CB. Konjac-mannan (glucomannan) improves glycemia and other associated risk factors for coronary heart disease in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 1999; (22):913–919.
16. Vuksan V, Sievenpiper JL, Owen R, Swilley JA, Spadafora P, Jenkins FJA, Vidgen E, Brighenti F, Josse RG, Leiter LA, Xu Z, Novokmet R. Beneficial effects of viscous dietary fibre from konjac-mannan in subjects with the in subjects with the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care.* 2000;(23):9–14.
17. Vuksan V, Sievenpiper JL, Xu Z, Wong EYY, Jenkins AL, Beljan-Zdravkovic U, Leiter LA, Josse RG, Stavro MP. Konjac-mannan and American ginseng: emerging alternatives therapies for type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr.* 2001; (20):370S–380S.
18. Sood N, Baker WL, Coleman CI. Effect of glucomannan on plasma lipid and glucose concentrations, body weight and blood pressure: systemic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2008;(88):1167–1175.
19. Chen HL, Cheng HC, Liu YJ, Liu SY, Wu WT. Konjac acts as a natural laxative by increasing stool bulk and improving colonic ecology in healthy adults. *Nutrition* , 2006;(22):1112–1119.
20. Chen HL, Fan YH, Chen ME, Chan Y. Unhydrolyzed and hydrolyzed konjac glucomannans modulated cecal and fecal microflora in Balb/c mice. *Nutrition* , 2005;(21):1059–1064.
21. Chen HL, Cheng HC, Wu WT, Liu YJ, Liu SY. Supplementation of konjac glucomannan into a low-fibre Chinese diet promoted bowel movement and improved colonic ecology in constipated adults: a placebo-controlled, dietcontrolled trial. *J Am Coll Nutr.* 2008;(27):102–108.
22. Al-Ghazzewi FH, Khanna S, Tester RF, Piggott J. The potential use of hydrolysed konjac glucomannan as a prebiotic. *J Sci of Food Agric.* 2007;(87):1758–1766.

23. Elamir AA, Tester RF, Al-Ghazzewi FH, Kaal HY, Ghalbon AA, Elmegrahi NA, Piggott JR. Effects of konjac glucomannan hydrolysates on the gut microflora of mice. *Nutr Food Sci*, 2008;(38):422–429
24. Wang CH, Lai P, Chen ME, Chen HL. Antioxidative capacity produced by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus acidophilus*-mediated fermentations of konjac glucomannan and glucomannan oligosaccharides. *J Sci of Food Agric*. 2008;(88):1294–1300.
25. Onishi N, Kawamoto S, Suzuki H, Santo H, Aki T, Shigeta S, Hashimoto K, Hide M, Ono K. Dietary pulverized konjac glucomannan suppresses scratching behavior and skin inflammatory immune responses in NC/Nga mice. *Intern Archivf Allergy and Immunol*. 2007a;(144):95– 104.
26. Onishi N, Kawamoto S, Ueda K, Yamanaka Y, Katayama A, Suzuki H, Aki T, Hashimoto K, Hide M, Ono K. Dietary pulverized konjac glucomannan prevents the development of allergic rhinitis-like symptoms and IgE response in mice. *Biosci, Biotechnol and Biochem*, 2007b;(71):2551–2556.
27. Wu WT, Chen HL. Konjac Glucomannan and Inulin Systematically Modulate Antioxidant Defense in Rats Fed a High-Fat Fiber-free Diet. *J. Agric. Food Chem*. 2011; (59):9194–9200
28. Shimizu H, Yamauchi M, Kuramoto T, Kubota N, Matsuda M, Hoshita T. Effects of dietary Konjac mannan on serum and liver cholesterol levels and biliary bile acid composition in hamsters. *J. Pharmacobio-Dyn*. 1991;(14):371–375.
29. Yun-Hua H, Li-Shi Z, Hong-Ming Z, Rui-Shu W, Yin-Zhu Z. Influences of refined Konjac meal on the levels of tissue lipids and the absorption of four minerals in rats. *Biomed. Environ*. 1990;(3):306–314.
30. García C, García MD, Román D. [Angel GP] *Nutrición y enfermedad cardiovascular*. *Nutrición Clínica*-Tomo IV, Editora Medica Panamericana, 2ª edición, 2010.
31. Artiñano A, Castro M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *Br J Nutr*; 2009(102):1246-1253.
32. Agil A, Navarro-Alarcón M, Ruiz R, Abuhamad S, El-Mir M, Vázquez G. Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats. *J Pineal Res*. 2011;(50):207-212.
33. Olivero-David R, Schultz AM, Vázquez-Velasco M, González-Torres L, Bastida S, Benedí J, Sanchez-Reus MI, González-Muñoz MJ, Sánchez-Muniz FJ. Effects of Nori- and Wakame-enriched meats with or without supplementary cholesterol on arylesterase activity, lipaemia and lipoproteinaemia in growing Wistar rats. *Br J Nutr*. 2011;(106):476-1486.
34. Lopez-Lopez I, Bastida S, Ruiz-Capillas C, Bravo L, Larrea MT, Sánchez-Muniz FJ, Cofrades S, Jiménez-Colmenero F. Composition and antioxidant capacity of low-salt meat emulsion model systems containing edible seaweeds. *Meat Sci*. 2009;(83):492–498.
35. Hissin PJR and Hilf. Fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976;(74):214-226.
36. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 1978;(86):271–278.
37. Folch J, Less M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of the total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem*. 1957;(266):497-509.
38. Carrapiso AI, Timón ML, Petró M, Tejada JF, García C. In situ transesterification of fatty acids from Iberian pig subcutaneous adipose tissue. *Meat Sci*. 2000;(56):159-164.

39. Aprikian O, Busserolles J, Manach C, Mazur A, Morand C, Davicco M, Besson C, Rayssiguier Y, Rémésy C, Demigné C. Lyophilized apple counteracts the development of hypercholesterolemia, oxidative stress, and renal dysfunction in obese Zucker rats. *J Nutr* 2002;(132):1969-1976.
40. Galisteo M, Sánchez M, Vera R, González M, Anguera A, Duarte J, Zarzuelo A. A diet supplemented with husks of *Plantago ovata* reduces the development of endothelial dysfunction, hypertension, and obesity by affecting adiponectin and TNF-alpha in obese Zucker rats. *J Nutr* 2005;135:2399-2404.
41. Sánchez-Muniz FJ, Bastida S. Do not use the Friedewald formula to calculate LDL-cholesterol in hypercholesterolaemic rats. *Eur J Lipid Sci Tech* 2008;(110):295-301.
42. Sánchez-Muniz FJ. Dietary fibre and cardiovascular health. *Nutr Hosp*. 2012;(27):31-45.
43. Harris W. n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr*. 1997;(65):1645-1654.
44. Motz AC, Enrico. Is Oxidative Stress the Pathogenic Mechanism Underlying Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease? The Common Soil Hypothesis Revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;(24):816-823.
45. Grotto D, Valentini J, Boeira S, Paniz C, Maria LS, Vicentini J, Moro A, Charão M, Garcia SC. Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo. *Quim. Nova*. 2008;(31)No. 2, 275-279.
46. Viejo J, García-Linares MC, Bastida S, García-Arias MT, Sánchez-Muniz FJ. Effect of olive oil-fried sardine consumption on liver lipid composition and fatty acid esterification in hypercholesterolemic rats. *Food Sci Technol Int*. 2003;(9): 329-338.
47. Sánchez-Muniz FJ, García-Linares MC, García-Arias MT, Bastida S, Viejo J. Fat and protein from olive oil-fried sardines interact to normalize serum lipoproteins and reduce liver lipids in hypercholesterolemic rats. *Journal of Nutrition*. 2003;(133): 2302-2308.
48. Bocanegra A, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ. Differential effects of konbu and nori seaweed dietary supplementation on liver glutathione status in normo- and hypercholesterolaemic growing rats. *Br J Nutr* 2006;(95):696-702.
49. Beynen A, Boogaard A, Van Laack H, Katan M. Cholesterol metabolism in two strains of rats with high or low response of serum cholesterol to a cholesterol-rich diet. *J Nutr* 1984;(114):1640-1651

