LUIZA DE PAULA DIAS MOREIRA

EFEITO DA SEMENTE E DO ÓLEO DE CHIA (*Salvia hispanica* L.) NAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM RATOS ALIMENTADOS COM DIETA RICA EM GORDURA SATURADA E FRUTOSE

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição para obtenção do título de *Magister Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2019

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

M838e
2019

Moreira, Luiza de Paula Dias, 1991-
Efeito da semente e do óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) nas alterações metabólicas em ratos alimentados com dieta rica em gordura saturada e frutose / Luiza de Paula Dias Moreira. – Viçosa, MG, 2019.
xv, 86 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.
Orientador: Hercia Stampini Duarte Martino.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 70-85.

1. Ácido alfa linolênico. 2. Frutose. 3. Síndrome metabólica. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e Saúde. Progra de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição. II. Título.

CDD 22. ed. 613.284

LUIZA DE PAULA DIAS MOREIRA

EFEITO DA SEMENTE E DO ÓLEO DE CHIA (*Salvia hispanica* L.) NAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM RATOS ALIMENTADOS COM DIETA RICA EM GORDURA SATURADA E FRUTOSE

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de julho de 2019.

Helen Hermana Miranda Hermsdorff
(Coorientadora)

Maria Eliza de Castro Moreira
(Coorientadora)

Renata Lopes Celi Toledo

Hércia Stampini Duarte Martino
(Orientadora)

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais, à minha avó Imaculada, à orientadora amiga Hércia Stampini, e à querida amiga Inês Dantas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre me iluminar, guiar os meus passos, e derramar muitas bênçãos em meu caminho!

Gratidão aos meus pais! À minha mãe, pelo amor incondicional, pela minha formação, que juntamente com minha avó me deram todo apoio necessário para eu ir sempre mais longe. Ao meu pai, pela dádiva da vida e por sempre me apoiar nos estudos. À toda minha família e amigos pela torcida e bons momentos. À minha prima Sílvia, irmã do coração, incentivadora nesta caminhada acadêmica e na vida. Ao Vinícius, meu amor, pelo carinho, incentivo, paciência, apoio e por acreditar nos meus sonhos, muito obrigada por tudo que você representa para mim.

À minha orientadora e amiga Hércia Stampini Duarte Martino, pela orientação, aprendizado, por acreditar e incentivar os meus sonhos, pelo incondicional apoio e acolhimento em todos os momentos. Sou eternamente grata! Aos meus coorientadores e professores, Helen Hermana Miranda Hermsdorff, Maria Eliza de Castro Moreira, e Frederico Augusto Ribeiro de Barros, pela disponibilidade, apoio e aprendizado nesta etapa!

À Maria Inês Dantas Bastiani, minha profunda, imensa e eterna gratidão por tudo: acolhimento, oportunidades, apoio e incentivo! Às professoras, Rita de Cássia Gonçalves Alfenas, pelo aprendizado e carinho, à Maria do Carmo Gouveia Peluzio, pelas conversas e aprendizado no estágio em ensino. Ao professor Sérgio Luis Pinto da Matta, pelo apoio e ajuda nas análises histológicas. Ao professor Reinaldo Francisco Teófilo, e ao técnico de laboratório/doutorando Ulisses de Oliveira, pela ajuda na análise de cromatografia gasosa.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição Experimental, pela oportunidade de crescimento, ensinamentos, contribuições, e momentos de descontração! À Renata Celi, pelo aprendizado, ajuda, orientação e contribuição em todas as etapas do mestrado, muito obrigada! À equipe de experimento, Bárbara Nery, Oscar Medina, Rodrigo Cardoso e Jaque Theodoro, que foram mais do que parceiros, e sim, grandes amigos! À Haira Guedes, pela parceria de sempre, e torcida em todas as etapas! Ao IC Vinícius Brilhante, pela excelente parceria, competência, ajuda e realização em todas as etapas, e a Andressa Assis, por toda disponibilidade! Ao Luiz Ladeira, pelo grande aprendizado, disponibilidade e ajuda nas análises histológicas. À Talitha Meneguelli, pela amizade e conversas enriquecedoras da

UFJF para a vida, à Bruna dos Santos, pela ajuda e incentivo; à Jaque Piovezana, Jéssica Mattar, Larissa Chaves, e Mirian Campos, pela parceria e trabalho em equipe.

Aos laboratórios da UFV: Laboratório de Nutrição Experimental e Laboratório de Desenvolvimento de Novos Produtos (DNS); Laboratório de Química de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos e ao técnico Pio, pela ajuda na produção do óleo; Laboratório de Análise de Alimentos (DNS) e ao técnico Ricardo, Laboratório de Análises Clínicas (DNS e Divisão de Saúde) e a técnica Solange, Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral, Laboratório MCDA do Departamento de Química e Laboratório de Biotecnologia e Pós-colheita de Macaúba do Departamento de Fitotecnia.

Aos animais, respeito e gratidão por terem dado a vida para a realização do trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, ao programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, e a todo o Departamento de Nutrição e Saúde, professores e membros, pela oportunidade de realização do mestrado e crescimento profissional. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pesquisa.

À banca examinadora por suas sugestões e contribuições para a melhoria deste trabalho.

Muito obrigada a todos vocês que me ajudaram e incentivaram de alguma forma, minha eterna e profunda gratidão!

BIOGRAFIA

LUIZA DE PAULA DIAS MOREIRA, filha de Geraldo Magela Dias Moreira e Luciana Dantas de Paula, nasceu na cidade de Viçosa, Minas Gerais, em 20 de abril de 1991.

Em agosto de 2011, ingressou no Curso de Nutrição da Universidade Federal de Juiz de Fora, graduando-se Nutricionista em agosto de 2016, com período de mobilidade acadêmica pela Universidade Federal de Viçosa (2014). Foi bolsista de iniciação científica (CNPq, PIBITI), projeto de extensão, e monitoria. Foi integrante do "Grupo de Pesquisa em Nutrição e Saúde Coletiva" e estagiária em microbiologia de alimentos no Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Em agosto de 2016 a julho de 2017, realizou aprimoramento profissional e atuou como pesquisadora colaboradora nos laboratórios de Nutrição Experimental e de Desenvolvimento de Novos Produtos do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, sob a coordenação da professora Hércia Stampini Duarte Martino. Foi membro do grupo de pesquisa em "Estudos Experimentais com Alimentos e Planejamento Alimentar" nesta mesma instituição.

Em agosto de 2017, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição da Universidade Federal de Viçosa, na área de Valor Nutricional, Funcional e Controle de Qualidade de Alimentos e de Dietas, submetendo-se à defesa da dissertação em julho de 2019.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS viii
LISTA DE FIGURAS x
LISTA DE TABELAS xi
RESUMO xii
ABSTRACT xiv
1. INTRODUÇÃO 1
2. OBJETIVOS 3
2.1. Objetivo geral 3
2.2. Objetivos específicos 3
3. REFERENCIAL TEÓRICO 4
3.1. Influência dos alimentos industrializados no surgimento de alterações metabólicas 4
3.2. Metabolismo da frutose 5
3.3. Alterações metabólicas causadas por dietas desequilibradas 8
3.5. Chia: semente e óleo 15
3.5.1. Composição química da chia 16
3.5.2. Potencial funcional da semente, farinha e óleo de chia 18
4. MATERIAL E MÉTODOS 29
4.1. Locais de execução 29
4.2. Semente de Chia 29
4.3. Obtenção do óleo de chia 29
4.4. Composição centesimal da semente de chia 30
4.5. Determinação da capacidade antioxidante total da semente de chia 30
4.6. Determinação do teor total de compostos fenólicos da semente de chia 31
4.7. Perfil de ácidos graxos do óleo de chia 31
4.8. Índice de peróxido do óleo de chia 32
4.9. Acidez do óleo de chia 33
4.10. Ensaio biológico 33
4.10.1. Animais 33
4.10.2. Cálculo amostral 33

4.10.3. Delineamento experimental 34
4.10.4. Dietas Experimentais 36
4.10.5. Eutanásia 38
4.10.6. Dados biométricos e consumo alimentar 38
4.11. Análises bioquímicas 39
4.12. Preparo do homogenato do fígado 39
4.12.1. Determinação do teor de proteína total do fígado 39
4.12.2. Malondialdeído (MDA) 40
4.12.3. Catalase (CAT).....41
4.12.4. Óxido nítrico (NO).....42
4.12.5. Capacidade Antioxidante Total (TAC) 42
4.13. Análises histomorfométricas do fígado 44
4.14. Análises estatísticas 44
5. RESULTADOS 45
5.1. Composição química da semente e do óleo de chia. 45
5.2. Efeitos dos tratamentos no consumo alimentar e medidas biométricas 46
5.3. Efeitos dos tratamentos na adiposidade..... 48
5.4. Efeitos dos tratamentos nas variáveis bioquímicas 49
5.5. Efeito na capacidade antioxidante total, enzimas antioxidantes e biomarcadores do estresse oxidativo 51
5.6. Efeitos na inflamação 53
5.7. Efeitos nas medidas histomorfométricas no fígado..... 54
6. DISCUSSÃO 58
7. CONCLUSÃO.....68
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS 69
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 70
ANEXO I 86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGS: ácidos graxos saturados

AIN-93M: dieta controle normal

ALA: ácido graxo α-linolênico

ALT: aspartato aminotransferase

AOAC*:* do inglês: *Association of official analytical chemistry*

ApoB: apolipoproteína B

AST: alanina aminotransferase

ATP: adenosina trifosfato

CAT: catalase

CPT-1: Carnitina Palmitoil Transferase 1

DCNT: doenças crônicas não-transmissíveis

DHA: ácido docosahexaenóico

DHGNA: doença hepática gordurosa não-alcoólica

HDF: Dietas hiperlipídicas (do inglês: *high fat diet*)

DMT2: diabetes *mellitus* tipo 2

DNS: Departamento de Nutrição e Saúde

EPA: ácido eicosapentaenoico

ERN: espécies reativas de nitrogênio

EROs: espécies reativas de oxigênio

GPx: glutationa peroxidase

HFCS: xarope de milho rico em frutose (do inglês: *high fructose corn syrup)*

HFHF: dieta rica em gordura saturada e fructose (do inglês: *high fat and high fructose diet*)

IL-1β: interleucina 1β

IL-6: interleucina 6

LNE: Laboratório de Nutrição Experimental

MDA: malondialdeído

NASH: esteato-hepatite não-alcoólica

NF-κB: fator de transcrição nuclear *kappa* B

NO: óxido nítrico

OC: óleo de chia

PGC1-α: coativador-1 alfa do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma

PPAR-α: receptor ativado por proliferador de peroxissoma-α

PUFAs: ácidos graxos poli-insaturados

RI: resistência à insulina

RNL: razão neutrófilo/linfócito

SC: semente de chia

SOD: superóxido dismutase

SREBP1c: proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1c

TA: tecido adiposo

TAC: capacidade antioxidante total (do inglês: *total antioxidant capacity*)

TG: triglicerídeos

TLR4: receptor 4 Toll-like

TNF: fator de necrose tumoral

UFV: Universidade Federal de Viçosa

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade

ω-3: ômega-3

ω-6: ômega-6

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias metabólicas da frutose e inter-relação com os metabolismos lipídico e glicídico.

Figura 2. Bioconversão do ácido alfa-linolênico.

Figura 3. Desenho experimental.

Figura 4. Cromatograma do óleo de chia com identificação dos ácidos graxos.

Figura 5. Adiposidade dos animais.

Figura 6. Avaliação da capacidade antioxidante total, enzimas antioxidantes e biomarcadores do estresse oxidativo.

Figura 7. Avaliação da inflamação dos animais.

Figura 8. Peso do fígado, Índice hepatossomático e grau de esteatose dos animais.

Figura 9. Fotomicrografias representativas de cortes de fígado dos animais.

Figura 10. Alterações metabólicas causadas pelo consumo de dieta rica em gordura saturada e frutose (HFHF) e efeitos da semente e do óleo de chia encontrados em nosso estudo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Potencial efeito da semente, farinha ou óleo de chia sob parâmetros metabólicos em estudos com animais.

Tabela 2. Potencial efeito da semente de chia em estudos com humanos.

Tabela 3. Variáveis bioquímicas de ratos Wistar induzidos a alterações metabólicas com dieta HFHF durante 8 semanas.

Tabela 4. Composição das dietas experimentais.

Tabela 5. Caracterização química da semente de chia.

Tabela 6. Consumo alimentar e medidas biométricas de ratos Wistar alimentados com dieta HFHF e tratados com semente ou óleo de chia durante 10 semanas.

Tabela 7. Variáveis bioquímicas de ratos Wistar induzidos a alterações metabólicas com dieta HFHF e tratados com semente ou óleo de chia durante 10 semanas.

Tabela 8. Histomorfometria do fígado de ratos Wistar induzidos a alterações metabólicas com dieta HFHF e tratados com semente ou óleo de chia durante 10 semanas.

RESUMO

MOREIRA, Luiza de Paula Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Efeito da semente e do óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) nas alterações metabólicas em ratos alimentados com dieta rica em gordura saturada e frutose.** Orientador: Hércia Stampini Duarte Martino. Coorientadores: Helen Hermana Miranda Hermsdorff, Maria Eliza de Castro Moreira e Frederico Augusto Ribeiro de Barros.

O consumo de dietas ricas em gorduras saturadas e carboidratos está associado ao aumento da adiposidade corporal, dentre outras complicações metabólicas, como estresse oxidativo, inflamação e esteatose hepática. Nesse sentido, surge a necessidade em pesquisar alimentos com alto potencial funcional que possam auxiliar nesse controle metabólico. A semente de chia (*Salvia hispanica* L.) se destaca devido ao seu elevado conteúdo de fibras alimentares, micronutrientes e compostos fenólicos, e o seu óleo, rico em compostos bioativos como ácido alfa-linolênico, fenólicos, e tocoferóis, que podem exercer efeitos benéficos à saúde por modular positivamente as alterações metabólicas causadas pelo consumo de dietas desequilibradas. Este estudo investigou os efeitos do consumo da semente e do óleo de chia na modulação de alterações metabólicas em ratos alimentados com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFHF). O ensaio biológico utilizou 40 ratos machos adultos Wistar, que foram alocados inicialmente em dois grupos experimentais, que receberam dieta padrão (AIN-93M - controle normal; n=10) e dieta rica em gordura saturada e frutose (HFHF; n=30) contendo 4% de lipídio proveniente do óleo de soja, para indução de alterações metabólicas durante 8 semanas. Após este período, os animais do grupo HFHF foram randomizados em três grupos para avaliar o efeito das dietas tratamento na reversão das alterações metabólicas causadas pela dieta HFHF, no período experimental de 10 semanas. Estes animais receberam dieta HFHF (controle positivo - grupo HFHF); dieta HFHF com substituição dos 4% de óleo de soja para o lipídio proveniente da semente de chia (equivalente a 14,73% de semente - grupo SC); e dieta HFHF com substituição dos 4% de óleo de soja para o lipídio proveniente do óleo de chia (equivalente a 4% de óleo de chia - grupo OC). Foram avaliados dados biométricos, consumo alimentar, variáveis bioquímicas, estresse oxidativo, inflamação e histomorfometria dos animais. Os dados foram submetidos à análise de variância One-way (ANOVA), seguido pelo teste *post-hoc* Newman-Keuls, com nível de

significância de $P < 0,05$. Como resultados, a dieta HFHF induziu alterações metabólicas nos animais observadas pelo aumento das variáveis: adiposidade corporal, glicemia, níveis de triglicerídeos (TG), enzimas hepáticas AST e ALT, ácido úrico, óxido nítrico (NO) hepático, fator de necrose tumoral (TNF) no fígado, razão neutrófilo/linfícito (RNL). Além do mais, a dieta HFHF reduziu a TAC no fígado, e induziu esteatose hepática nos animais. O consumo da semente e do óleo de chia restaurou o sistema antioxidante observado pelo aumento dos níveis de superóxido dismutase no fígado, e ambos apresentaram redução do grau de esteatose hepática. Além do mais, o consumo do óleo de chia atuou na redução da adiposidade corporal, glicemia, TG sérico, NO, e a RNL. A semente e o óleo não foram eficazes em reduzir os níveis de AST, ALT e ácido úrico, assim como os níveis de TNF no fígado, e também não apresentaram aumento na TAC no fígado. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais, em relação ao malondialdeído e catalase no fígado dos animais, e TAC no plasma. Em conclusão, o consumo de chia foi eficaz na melhora das alterações metabólicas causadas pelo consumo de dietas ricas em gordura saturada e frutose em ratos. Mais estudos são necessários para estabelecer quantidades seguras e eficazes, sem risco de toxicidade, para possível extrapolação para consumo humano.

ABSTRACT

MOREIRA, Luiza de Paula Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. Advisor: **Effect of chia seed and chia oil (*Salvia hispanica* L.) on metabolic alterations in rats fed with high saturated fat and high fructose diet.** Hércia Stampini Duarte Martino. Co-advisers: Helen Hermana Miranda Hermsdorff, Maria Eliza de Castro Moreira and Frederico Augusto Ribeiro de Barros.

The consumption of diets rich in saturated fat and carbohydrates is associated with increased body fat, among other metabolic changes such as oxidative stress, inflammation and liver steatosis. In this scenario, there has been a need to study foods with high functional properties that can assist in this metabolic control. The chia seed (*Salvia hispanica* L.) stands out due to its high content of dietary fiber, micronutrients and phenolic compounds, whereas its oil is a rich source of bioactive compounds such as alpha-linolenic acid, phenolics and tocopherols. All the above-mentioned substances can exert beneficial health effects by positively modulating metabolic changes caused by the consumption of unbalanced diets. Hence, this study aimed to investigate the effects of chia seed and chia oil consumption on the modulation of metabolic changes in rats fed with high saturated fat and fructose (HFHF) diet. For the *in vivo* assay, 40 adult male Wistar rats were allocated initially into two experimental groups, which received standard diet (AIN-93M - normal control; n = 10) or HFHF diet (n = 30) containing 4% lipid from soybean oil to induce metabolic changes for 8 weeks. After this period, the HFHF group animals were randomized into three groups to evaluate the effect of the treatment diets on the reversal of metabolic changes caused by the HFHF diet for an experimental period of 10 weeks. These animals received HFHF diet (positive control - HFHF group); HFHF diet with substitution of 4% soybean oil for lipid from chia seed (equivalent to 14.73% seed - group SC); and HFHF diet with substitution of 4% soybean oil for lipid from chia oil (equivalent to 4% chia oil - group OC). Biometric data, food intake, biochemical variables, oxidative stress, inflammation and histomorphometry of the animals were evaluated in this study. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA), followed by the Newman-Keuls *post-hoc* test, with a significance level of $P<0.05$. As a result, the HFHF diet induced metabolic changes in animals observed by increase of the variables: body adiposity, blood glucose, triglyceride (TG) levels, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) liver enzymes, uric acid, hepatic nitric oxide (NO), tumor

necrosis factor (TNF) in the liver, and neutrophil to lymphocyte ratio (RNL). In addition, the HFHF diet reduced TAC in the liver and induced hepatic steatosis in the animals. The consumption of chia seed and oil restored the antioxidant system as evidenced by the increased levels of superoxide dismutase in the liver and reduction in the degree of hepatic steatosis. Moreover, the consumption of chia oil reduced body adiposity, glycemia, serum TG, NO in the liver, and RNL. The seed and oil were not effective in reducing AST, ALT and uric acid levels, as well as TNF levels in the liver, and did not increase total antioxidant capacity (TAC) in the liver. There was no significant difference among the experimental groups with regards to malondialdehyde and catalase in the liver, and TAC in the plasma. In conclusion, chia intake was effective in improving metabolic changes caused by the consumption of diets rich in saturated fat and fructose in rats. Further studies are needed to establish safe and effective amounts, without risk of toxicity, for possible extrapolation for human consumption.

1. INTRODUÇÃO

O consumo de alimentos ultra processados é observado principalmente na dieta da população ocidental, e está associado com excesso de peso, quadro pró-inflamatórios e aumento do risco de desenvolver DCNT, como síndrome metabólica, obesidade, diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2), doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA), hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, doenças cardiovasculares e neurodegenerativa e câncer (JAACKS et al., 2019, NYBERG et al., 2018; POTI; BRAGA; QIN, 2017; WHO, 2015).

Esse perfil alimentar caracteriza-se pelo alto teor de carboidratos simples, como frutose na forma de xarope de milho (do inglês: *high fructose corn syrup* - HFCS), além do baixo conteúdo de fibras alimentares, micronutrientes, e compostos bioativos, como os fenólicos, e apresenta elevado consumo de gorduras saturadas e *trans* (TER HORST; SERLIE, 2017). O alto consumo de ácidos graxos poli-insaturados ômega-6 (ω-6), e o baixo de ômega-3 (ω-3), aumenta a razão ω-6:ω-3, estimado entre 20:1 a 25:1, podendo chegar até 50:1. De acordo com a WHO, a recomendação dessa razão deve ser de 5-10:1. O aumento do consumo de ω-6 pode levar a diminuição dos níveis de ω-3 nos tecidos (FAO, 1994; BLASBALG et al., 2011; SIMOPOULOS, 2004; AZIZ et al., 2010). Tais características expõem o indivíduo a um ambiente propício ao surgimento e progressão de alterações metabólicas e modificações celulares (CRESCENZO et al., 2018; KHADGE et al., 2018; INNES; CALDER, 2018).

O excesso de adiposidade corporal é uma alteração metabólica, a qual afeta o metabolismo de macronutrientes, que resulta em hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, e ocasiona disfunção e eventual morte dos mesmos. Esse processo provoca aumento de citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez, ativam vias e expressão de genes pró-inflamatórios (WOO et al., 2019). Além disso, desordens metabólicas, como aumento da lipotoxicidade, acúmulo de lipídios no fígado, estão relacionados ao prejuízo da sensibilidade à insulina e intolerância à glicose (JEGATHEESAN; DE BANDT, 2017). Assim, o acúmulo de lipídios no tecido hepático, ativa a lipogênese e reduz a beta-oxidação, exacerbando a inflamação hepática e sistêmica (LONARDO et al., 2018; JENSEN et al., 2018; NYBERG et al., 2018). Todas essas alterações metabólicas estão associadas com o estresse oxidativo, devido ao desequilíbrio do sistema redox, gerado por meio do aumento

de radicais livres, peroxidação lipídica, redução da capacidade antioxidante total e das enzimas antioxidantes endógenas (BERNARDES et al., 2017; KHOSRAVI et al., 2019).

Nesse contexto, cresce a busca por alternativas naturais de origem vegetal, que possuam bom perfil nutricional, com alto conteúdo de micronutrientes e compostos bioativos, que possam auxiliar na reversão de alterações metabólicas causadas por dietas desbalanceadas. Nesse sentido, a semente de chia (*Salvia hispanica* L.) se destaca pelo seu alto potencial funcional, por meio do elevado conteúdo de ácido graxo α-linolênico (ALA), fibras alimentares, proteínas e compostos bioativos (OLIVEIRA-ALVES et al., 2017; Da SILVA et al., 2017; GRANCIERI; MARTINO; de MEJIA, 2018). Estudos realizados com animais, e poucos com humanos, mostram efeitos benéficos da chia, na forma de semente, farinha e óleo, na modulação do estresse oxidativo, redução da resistência à insulina, adiposidade, perfil lipídico e da inflamação, além de efeitos anti-hipertensivos (Da SILVA et al., 2019; MARINELI et al., 2015a; FONTE-FARIA et al., 2019; TOSCANO et al., 2015, VUKSAN et al., 2017). Contudo, poucos estudos da literatura avaliaram os efeitos da chia, principalmente na forma de óleo em animais, tendo estes, desfechos conflitantes em relação ao tempo de experimento, quantidade ofertada e o tipo de animal utilizado, se rato, ou camundongo. Além disso, apenas cinco estudos utilizaram a dieta rica em gordura saturada e frutose, como modelo dietético de indução de alterações metabólicas, à fim de verificar os efeitos da chia na forma de semente e óleo (MARINELI et al., 2015a; MARINELI et al., 2015b) e semente de chia (POUDYAL et al., 2013; POUDYAL et al., 2012a; POUDYAL et al., 2012b). Entretanto, nenhum destes, avaliaram o efeito da chia sob a inflamação.

Diante do exposto, torna-se necessário investigar os efeitos da semente e do óleo em modelo animal induzido a alterações metabólicas por meio do consumo de dieta rica em gordura saturada e frutose (HFHF), características principalmente de dietas ocidentais. Portanto, a hipótese do presente estudo baseia-se na premissa de que a semente e o óleo de chia modulam processos como adiposidade corporal, esteatose hepática, inflamação e estresse oxidativo em ratos alimentados com uma dieta HFHF.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o efeito do consumo da semente e do óleo de chia, na modulação da adiposidade, na inflamação, no estresse oxidativo, e na esteatose hepática em ratos machos adultos alimentados com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFHF).

2.2. Objetivos específicos

a) Caracterizar a composição centesimal, o conteúdo de fenólicos totais e analisar a capacidade antioxidante da semente de chia;

b) Avaliar a estabilidade oxidativa e o estado de conservação do óleo de chia

c) Caracterizar o perfil de ácidos graxos do óleo de chia;

c) Avaliar o efeito da semente e do óleo de chia nas medidas biométricas, ganho de peso e consumo alimentar em ratos alimentados com dieta rica em gordura saturada e frutose (do inglês: *high fat high fructose* - HFHF);

d) Avaliar o efeito da semente e do óleo de chia nas variáveis bioquímicas, tais como glicose, triglicerídeo, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ácido úrico em ratos alimentados com dieta HFHF;

e) Avaliar o efeito da semente e do óleo de chia na inflamação, estresse oxidativo e histomorfometria hepática em ratos alimentados com dieta HFHF.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Influência dos alimentos industrializados no surgimento de alterações metabólicas

As modificações nos padrões alimentares podem ser fundamentadas pela industrialização e crescente mercado da indústria alimentícia e seu *marketing*, sendo capazes de influenciar o comportamento alimentar da população (MONTEIRO et al., 2013). Por conta desse impacto no perfil alimentar, houve redução do tempo em realizar e preparar refeições em casa, e consequente aumento do consumo de alimentos prontos e maior utilização de serviços *fast food*, já que são de rápido e fácil acesso, além de serem relativamente baratos (MONTEIRO et al., 2013; MONTEIRO; CANNON, 2012). Esse tipo de alimentação é observado principalmente na população ocidental. Uma análise comparativa dos dados das pesquisas de orçamentos familiar (POFs) de 2002-2003 e 2008-2009, observou-se aumento de 22% no consumo de alimentos ultraprocessados pelos brasileiros (MARTINS et al., 2013). Nesse sentido, é preocupante a atual tendência do elevado consumo dos mesmos, uma vez que possuem alta densidade energética e baixa qualidade nutricional. Os alimentos industrializados apresentam alta quantidade de adoçantes artificiais, sal, conservantes, emulsificantes e realçadores de sabor, e são pobres em antioxidantes naturais, como as vitaminas, minerais e compostos bioativos (MONTEIRO et al., 2013; MONTEIRO; CANNON, 2012). Além disso, possuem baixo teor de fibras alimentares e apresentam alto conteúdo de carboidratos simples, que conferem alto índice glicêmico e são capazes de modular os mecanismos hipotalâmicos, os quais levam a redução da saciedade e aumento da fome no indivíduo (SCHULTE; AVENA; GEARHARDT, 2015). Os carboidratos simples, como a glicose e a frutose, são considerados fatores pró-inflamatório (TER HORST; SERLIE, 2017; MONTEIRO et al., 2011), com um destaque para o último. A frutose é consumida, principalmente, por meio de produtos ricos em xarope de milho com alto teor de frutose (do inglês: *high fructose corn syrup* - HFCS) (MURPHY; JOHNSON, 2003; ALLER et. al., 2013), que tem sido relatado em contribuir para a instabilidade metabólica crônica, a qual induz aumento da peroxidação de lipídios, ativação da lipotoxicidade e de vias inflamatórias a nível sistêmico e hepático, resistência à insulina acúmulo de gordura no fígado e estresse oxidativo (BERNARDES et al., 2017; FAN; CAO, 2013).

O aumento do consumo de alimentos ultraprocessados e a baixa ingestão de alimentos ricos em ômega-3, como peixes, oleaginosas e sementes, como chia e linhaça, estão associados com a baixa qualidade de lipídios. Esse perfil alimentar apresenta elevada quantidade de gorduras saturada e *trans*, e redução de ácidos graxos poli-insaturados, além do desequilíbrio da razão no consumo ω-6:ω-3 (KHADGE et al., 2018 ; MENDONÇA et al., 2016; MONTEIRO et al., 2013). Esse perfil pode expor o indivíduo a um ambiente propício ao surgimento e progressão de alterações metabólicas, como estado pró-oxidativo e pró-inflamatório sendo capaz de alterar a função da membrana celular e ocasionar efeitos deletérios (CHEN et al., 2017).

Contudo, não só a qualidade da alimentação, mas também a ingestão excessiva de alimentos, como dietas com alta densidade calórica, tem influência no desenvolvimento de alterações metabólicas. O desequilíbrio energético associado à redução dos níveis de atividade física, resultam em balanço energético positivo crônico, o qual proporciona acúmulo excessivo de gordura corporal (LEE et al., 2012). A adiposidade pode alterar o metabolismo, e representar um fator de risco para desenvolver DCNT, dentre elas, a, dislipidemias, DMT2, DHGNA, hipertensão arterial sistêmica, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, acidente vascular cerebral, e câncer (NYBERG et al., 2018; GROVER et al., 2015; PRATT et al., 2014, NG et al., 2014; NATIONAL HEART & BLOOD INSTITUTE, 1998; DINICOLANTONIO; LUCAN; KEEFE, 2015; CHEN et al., 2017; KHADGE et al., 2018).

3.2. Metabolismo da frutose

A frutose é uma hexose, conhecida também como levulose, cuja formula química C6H12O6 é idêntica à da glicose. Difere da glicose pela presença de um grupo ceto na posição 2 de sua cadeia de carbonos, versus um grupo aldeído na posição 1 da cadeia de carbonos da glicose (NSEIR et. al., 2010). É constituinte da sacarose (β-D-frutofuranosil α-D-glicopiranosida) e de outros polímeros denominados frutano ou inulina, além de ser encontrada sob a forma isolada na natureza em alimentos como frutas, verduras e mel (BARREIROS et. al., 2005).

Durante muitos anos, os seres humanos consumiram em torno de 15 a 24 g/dia de frutose (4-5% das calorias totais em relação a 2.000 kcal/dia) provenientes

principalmente de frutas e verduras. Atualmente, o maior consumo de frutose em países desenvolvidos e em desenvolvimento, são provenientes da adição do "xarope de milho de alta frutose" em refrigerantes, sucos, alimentos de baixo valor energético e livres de glúten. São utilizados principalmente, como adoçantes em substituição à sacarose e/ou glicose, devido ao intenso sabor doce, cerca de 1,7 vezes mais que a sacarose, e o seu baixo índice glicêmico (ROGLANS et. al., 2007). O consumo de xarope de milho rico em frutose pode atingir 60 a 100g/dia e até 150g/dia se somada a frutose proveniente da sacarose. Em relação ao Brasil, a ingestão de frutose ainda não está bem estabelecida. Estima-se consumo médio de 4,34g/dia de frutose livre, originária de frutas, doces, hortaliças e outros vegetais. A quantidade de frutose que provém da sacarose é de aproximadamente 27,5g/dia (IBGE, 1996).

Em relação ao seu metabolismo, no intestino delgado a frutose é metabolizada e difunde-se para os vasos sanguíneos através do transporte mediado pelo GLUT 2, presente no polo basolateral do enterócito. Dentro do enterócito, uma parte da frutose pode ser convertida em lactato e liberada para a circulação local. Enquanto que, por meio da circulação portal, a frutose entra no fígado pela superfície dos hepatócitos. Diferentemente da glicose, esse processo não requer hidrólise de adenosina trifosfato (ATP), e é independente da absorção de sódio (NELSON; COX, 2016). A frutose é absorvida mais lentamente que a glicose. Toda a frutose em excesso transportada para os hepatócitos, é quase que imediatamente degradada pela frutoquinase C, devido ao seu rápido metabolismo e utilização hepática, sem qualquer controle de *feedback* negativo, independente da necessidade de energia celular. Seu metabolismo ocorre independentemente da ação da insulina no fígado (CUI, et. al. 2004).

É clivada a gliceraldeído e diidroxicetona-fosfato pela frutose-1-fosfato-aldolase. A diidroxicetona-fosfato é convertida a gliceraldeído-3-fosfato por meio da enzima glicolítica triose-fosfato-isomerase e o gliceraldeído é fosforilado pelo ATP, e posteriormente gliceraldeído-3-fosfato pela triose-quinase, o qual entrará na via glicolítica, sendo essas duas primeiras reações enzimáticas singular do metabolismo da frutose (**Figura 1**). A partir desta fase, o metabolismo da frutose é semelhante ao da glicose (NELSON; COX, 2016; STEINMANN et al., 2001). Para sua conversão em frutose-1-fosfato, utiliza-se ATP, e o excesso pode resultar em

queda de fosfato intracelular e ATP, o que pode ocasionar um estresse mitocondrial (ABDELMALEK et al., 2012; BAWDEN et al., 2016; PATEL et al., 2015). Após uma sobrecarga, a frutose entra na via glicolítica, e sua exaustão leva ao acúmulo de intermediários da glicose. O seu excesso pode aumentar a produção de acetil-CoA para formação de energia na mitocôndria, ou glicerol-3-fosfato para a síntese de triglicerídeos, sendo estes combinados com ApoB e empacotados em lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) para secreção na corrente sanguínea (STEINMANN et al., 2001).

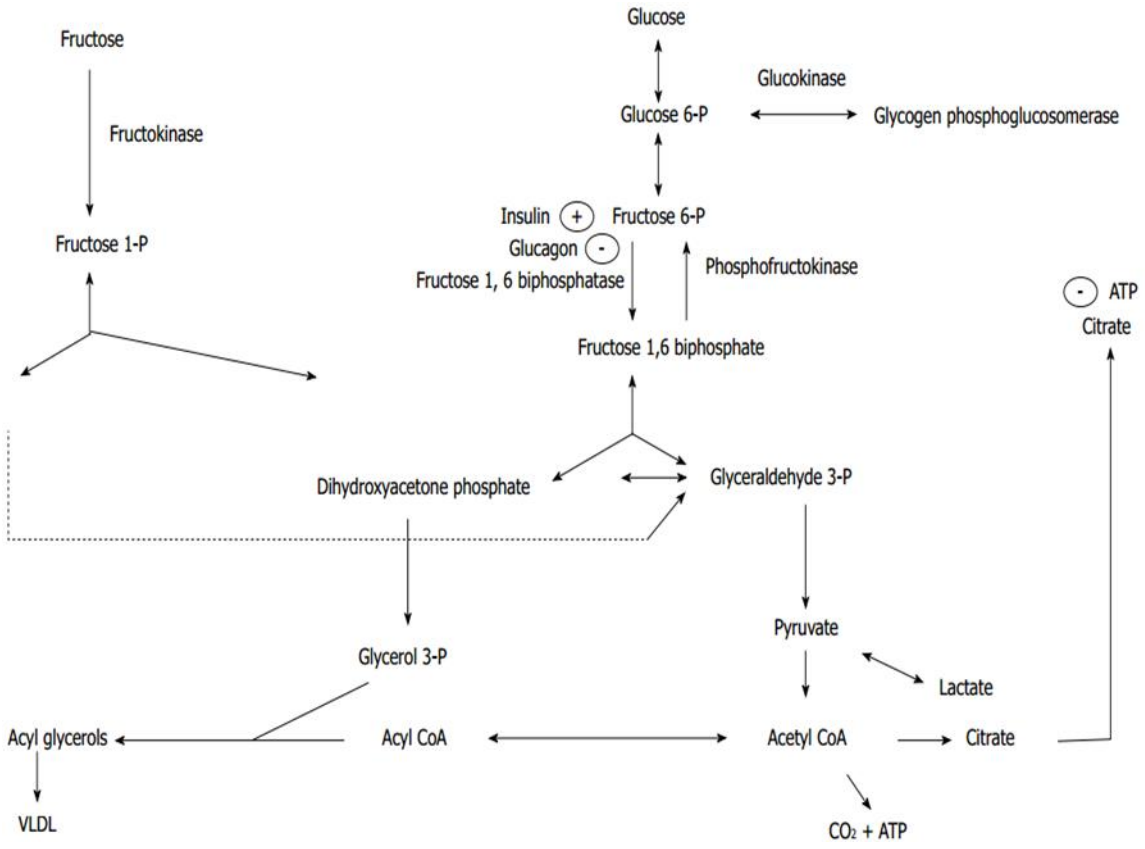

Figura 1: Via metabólica da frutose e inter-relação com o metabolismo lipídico e glicídico (NSEIR et. al., 2010).

3.3. Alterações metabólicas causadas por dietas desequilibradas

O processo desenvolve-se pelo acúmulo de gordura inicialmente no tecido adiposo. A adiposidade resulta-se em hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, ocasionando sua disfunção e eventual morte (PRATT et al., 2014; ABARCA-GÓMEZ et al., 2017). Esse processo acarreta em inflamação local por meio do aumento de citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez, ativam vias e expressão de genes pró-inflamatórios (ALEMANY, 2013). A produção de citocinas também ocorre em outros órgãos, além do tecido adiposo, tais como fígado, pâncreas e cérebro. O aumento das citocinas pró-inflamatórias principalmente no fígado, ativa vias inflamatórias (ALEMANY, 2013). Esse processo resulta em desordem metabólica dos macronutrientes, que culmina primeiramente em aumento das concentrações de glicose e insulina, com redução na sensibilidade à insulina e intolerância à glicose (JEGATHEESAN; DE BANDT, 2017).

As citocinas pró-inflamatórias, tais como, fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1β (IL-1β), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e o inibidor do fator ativador de plasminogênio 1 (PAI-1), são responsáveis por ativar um estado pró-inflamatório local e sistêmico (WOO et al., 2019). Além disso, observa-se redução dos níveis de adiponectina, uma adipocina anti-inflamatória, que também atua no metabolismo energético, e encontra-se em baixos níveis em indivíduos com excesso de peso corporal (BORGES et al., 2018; ALEMANY, 2013). Nesse processo pró-inflamatório, há aumento da infiltração de macrófagos no tecido adiposo, o que leva a ativação do receptor *Toll-like* 4 (TLR4) no fígado (BAFFY 2009).

O TLR4 também é ativado pelos ácidos graxos saturados (AGS), o qual este ativa TNF. O TLR4, assim como o TNF, medeia a ativação e expressão do fator nuclear kappa-B (NF-κB) (KIM et al., 2019; WOO et al., 2019). Ainda, o TNF, assim como a adiposidade, se correlaciona positivamente com um biomarcador de inflamação sistêmica, a razão neutrófilo/linfócito (RNL) (SUÁREZ-CUENCA et al, 2019). Além da inflamação, os lipídios podem atuar na sinalização e na expressão gênica da insulina, os quais afetam o metabolismo da glicose, prejudicando a homeostase glicose-insulina (ORMAZABAL et al., 2018). Esse processo gera aumento da glicemia, e o efeito da resistência à ação da insulina gera aumento a síntese de insulina pelas células β-pancreáticas devido a hiperglicemia.

O quadro de hiperinsulinemia, compensatório da RI, reduz a ação da insulina nos tecidos periféricos, o que leva a incapacidade dos adipócitos em armazenar gordura e, consequente aumento da lipólise nos adipócitos hipertrofiados por meio da ação da lipase sensível a hormônio (HSL) (ORMAZABAL et al., 2018). Posto que a insulina se torna incapaz de inativar a enzima HSL, este processo favorece a liberação de produtos lipolíticos, como os ácidos graxos livres (AGL) para a circulação, estando disponíveis para a captação hepática (ORMAZABAL et al., 2018; RAHIMI et al., 2013; BOLAND et al., 2018). Essa liberação de AGL de adipócitos disfuncionais e resistentes à insulina culminam em lipotoxicidade, resultado do acúmulo de metabólitos tóxicos derivados de AGL, os quais favorecer o acúmulo de lipídios no fígado (RAHIMI et al., 2013; MIQUILENA-COLINA et al., 2011).

A frutose e os AGS são substratos altamente lipogênicos, os quais contribuem para o acúmulo de triglicerídeo e da VLDL nos hepatócitos, que pode levar a retenção de lipídios hepáticos, conhecida como esteatose hepática (JENSEN et al., 2018a; PAGLIALUNGA; DEHN, 2016). A VLDL regula a esterificação de ácidos graxos versus oxidação. Se houver excesso da capacidade oxidativa nos hepatócitos, há uma redução da beta-oxidação de ácidos graxos, e acúmulo dos mesmos nos hepatócitos (TER HORST; SERLIE et al., 2017). A taxa de síntese de triglicerídeo, reesterificação de ácidos graxos ou lipogênese *de novo*, deve ser superior ao aumento da taxa de secreção de VLDL para que ocorra a retenção de lipídios no fígado (KOO, 2013). O acúmulo de lipídios nos hepatócitos, podem alterar os níveis das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST), e o aumento destas, está relacionado com lesão hepática (OZER et al., 2008). A atividade hepática da AST é citosólica, e observa-se seu maior aumento em relação à ALT em lesões hepáticas. Isso pode ser devido a AST ser um biomarcador menos sensível e que possui uma vida-média de 12 horas (RAMAIAH, 2007).

Dietas hiperlipídicas (HFD) adicionada de frutose, podem ocasionar o desenvolvimento de fibrose no tecido hepático, o que demonstra que dietas *high fat and high fructose* (HFHF), potencializam os danos hepáticos, desenvolvendo a esteato-hepatite não-alcoólica (NASH) (JAHN et a., 2019). Ainda, os níveis de TNF hepático e sistêmico, que ativam as vias pró-inflamatórias, agravam a RI e

aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Além do mais, os AGL induzem o estresse do retículo endoplasmático, que leva à regulação positiva das proteínas pró-apoptóticas, que pode levar a apoptose de hepatócitos (MENDEZ-SANCHEZ et al., 2018). Assim como as citocinas pró-inflamatórias, a lipotoxicidade ativa vias inflamatórias, as quais prejudicam a sinalização celular de células imunes, tecido adiposo, fígado e músculo, causando disfunção celular e lipoapoptose. Por consequência, esses processos levam a hiperglicemia, glicogenólise e gliconeogênese, exacerbando a RI, e aumentando as taxas de acúmulo de lipídio hepático, tendo um papel central no desenvolvimento da esteatose hepática, síndrome metabólica, DMT2, dentre outras DCNT (JEGATHEESAN; DE BANDT, 2017; LYONS; KENNEDY; ROCHE, 2016).

A produção de VLDL e da ApoB é regulada por meio da diminuição da expressão da proteína microssomal transferidora de triglicerídeos (MTP), a qual prejudica a exportação dos lipídios do fígado por meio da VLDL. Isso favorece o aumento do conteúdo de intermediários C18:1-diacilglicerol nos hepatócitos, o qual estimulará a síntese de triglicerídeo, comprometendo ainda mais a sinalização hepática da insulina por meio da ativação da proteína quinase Cε (PKCε) e por mecanismos compensatórios, os quais podem levar a hiperglicemia e hiperinsulinemia (TAKAMURA et al., 2012).

Ademais, o maior consumo de ATP pela frutose, pode causar deficiência hepática de fosfato e acumular AMP. Esse processo pode resultar no aumento da síntese de ácido úrico (LANASPA et al., 2012). No fígado, a queda do fosfato intracelular ativa a enzima AMP desaminase, que converte o AMP em monofosfato de inosina (IMP), e resulta na reposição de nucleotídeos da purina que culmina a formação do ácido úrico, por meio de precursores de aminoácidos (LEE et al., 2012; LANASPA et al., 2012). Portanto, a frutose é o único carboidrato que gera ácido úrico durante seu metabolismo, a qual aumenta sua síntese e seus níveis hepáticos (CHOI et al., 2008). Desse modo, esse aumento de ácido úrico pode estimular o acúmulo de lipídio hepático e reduzir a oxidação dos mesmos, e principalmente estimular a produção de EROs, via ativação da nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato (NADPH) oxidase, aumentando o estresse oxidativo (PASCHOS et al., 2009; CHOI et al., 2008).

O estresse oxidativo é o desequilíbrio do sistema oxidante, com aumento da produção de oxidantes e a desregulação da defesa antioxidante (KHOSRAVI et al., 2019). As EROs compreendem os grupos radicalares, como superóxido, peroxila e alcoxila; e os não-radicalares, como oxigênio, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e ácido hipocloroso. Já as espécies reativas de nitrogênio (ERN), são óxido nítrico (NO), óxido nitroso, ácido nitroso, nitritos, nitratos e peroxinitritos. Além disso, existem os íons metálicos, como espécies de ferro, cobre e enxofre que estão envolvidos no estresse oxidativo (KHOSRAVI et al., 2019). Pequenas quantidades de oxidantes são essenciais para manutenção da célula, incluindo funções na sinalização intracelular e sistema imunológico. Porém, o excesso de radicais livres prejudica o sistema redox, e pode levar a perda da defesa antioxidante, reduzindo a atividade biológica das enzimas e aumentando a forma oxidada das mesmas, ocasionando um desequilíbrio homeostático (ESTERBAUER et al., 1992). Além disso, os oxidantes podem causar danos à célula, DNA, proteínas e lipídios, podendo levar a apoptose e necrose celular (LENNON et al., 1991; SIES, 1999). O sistema antioxidante endógeno, modulado pelas enzimas antioxidantes, tais como glutationa peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), mantém o ambiente redutor dentro das células, processo considerado fisiológico (MEYER et al., 1996, IMAI et al., 1998, de HAAN et al., 1998). A enzima SOD é responsável por remover o ânion superóxido, e o converte em oxigênio e H_2O_2. Em seguida, a GPx e CAT decompõe H_2O_2. Existem três isoenzimas da SOD: SOD1 (Cu/Zn-SOD), presente no citosol da célula, SOD2 (Mn-SOD) presente nas mitocôndrias, e sua função é eliminar o superóxido formado nas mitocôndrias, protegendo contra o estresse oxidativo, sendo que a deficiência da mesma aumenta o estresse oxidativo e dano para mtDNA. Já a SOD 3, está presente na matriz extracelular, e sua função peroxidase, pode remover H_2O_2, mas esta por sua vez, pode inibir a atividade da SOD3 e SOD1 (HODGSON; FRIDOVICH, 1975). A CAT está presente no peroxissomo e citosol de todas as células humanas, e é responsável por controlar as concentrações de H_2O_2 nas células juntamente com a GPx, reduzindo a produção de hidroperóxidos lipídicos e radical hidroxila. Esta enzima atua principalmente quando há depleção da GPx (ALLENTOFF et al., 1992, STOCKER; KEANEY, 2004).

O estresse oxidativo pode ser estimulado pelo aumento de oxidantes por várias vias metabólicas. Exemplos de causas endógenas são a energia celular, elevada concentração de O_2, e inflamação. Dentre as causas exógenas, inclui-se a alimentação (KHOSRAVI et al., 2019). A peroxidação lipídica leva ao estresse oxidativo por meio dos radicais livres, que capturam elétrons dos lipídios na membrana celular e levam a alterações na permeabilidade, fluidez e integridade da mesma (BELENGUER-VAREA et al., 2019). A reação acontece principalmente com os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, pois são vulneráveis a reações oxidativas e consequentemente podem levar a peroxidação lipídica. Na lipoperoxidação de membranas, o malondialdeído (MDA) é derivado da β-ruptura de endociclização de ácidos graxos poliinsaturados, como ácido linoléico, araquidônico e docosahexaenóico (HALLIWELL, 2006).

O dano oxidante associado ao baixo consumo de alimentos ricos em antioxidantes, como frutas vegetais, oleaginosas, peixes, que possuem compostos bioativos, como os polifenóis, vitaminas e minerais ricos em antioxidantes naturais, induzem a diminuição da defesa do sistema antioxidante (SHIOMI et al., 2004), contribuindo para o aumento do estresse oxidativo. Em razão disso, torna-se importante o aumento do consumo de alimentos *in natura* com alto potencial funcional, ricos em nutrientes e compostos bioativos capazes de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, as quais neutralizam as EROs, contribuindo para a melhora do sistema antioxidante, com redução do dano e aumento da atividade celular.

3.4. Ácidos graxos poli-insaturados

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), são considerados essenciais por não serem sintetizados pelo organismo a partir dos ácidos graxos provenientes da síntese de novo (YOUDIM; MARTIN; JOSEPH; 2000), mas também podem ser sintetizados a partir de ácidos graxos advindos da dieta (BAKER et al., 2016). O ácido linoleico (C18:2) é da família ômega-6, e pode ser obtido de plantas verdes, nozes, linhaça, e alguns óleos vegetais, como soja e óleos de colza (CALDER, 2011). Este, produz o ácido araquidônico (AA; 20: 4n-6), que também pode ser obtido por meio do consumo de alimentos de origem animal, e desempenha um papel crucial na síntese dos eicosanóides. A família ω-3 apresenta benefícios ao organismo humano. O ALA (18:3n-3), é encontrado em plantas, como os vegetais verdes, algumas oleaginosas, como nozes, óleo de canola, e o óleo de soja, no qual o ALA contribui com 10% do total de ácidos graxos. O óleo de linhaça e de chia, são fontes que apresentam as maiores quantidades de ALA, sendo que o último, contribui com mais de 60% do total de ácidos graxos (RINCÓN-CERVERA et al., 2016; Da SILVA et al., 2017). O ALA proveniente da dieta pode ser destinado para incorporação nas membranas celulares e *pools* para armazenamento em tecidos, produção de energia ou conversão em ω-3 de cadeia mais longa PUFAs no fígado (BAKER et al., 2016). Esse ácido graxo é precursor metabólico dos ácidos, eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA) e docosahexaenóico (22:6n-3, DHA) (**Figura 2**), que são óleos encontrados em peixes (MARTIN et al., 2006). EPA e DHA possuem alto potencial em modificar propriedades biofísicas das membranas celulares, alterar a sinalização celular e a expressão gênica (CALDER, 2014).

A bioconversão do ALA, em EPA e DHA, acontece por meio de processos como a dessaturação, alongamento e beta-oxidação. Essa regulação se dá por meio do receptor ativado por proliferador de peroxissoma-α (PPAR-α) e da proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1c (SREBP1c), que regulam enzimas envolvidas na síntese e oxidação de ácidos graxos (NELSON; COX, 2016). O ácido graxo linoleico e o ALA competem pelas mesmas enzimas envolvidas na biossíntese hepática de PUFAs ω-3, por meio das reações de alongamento da cadeia e dessaturação, mesmo estas enzimas tendo maior afinidade pelo ALA, principalmente a delta-6 dessaturase (BAKER et al., 2016; NELSON; COX, 2016). A expressão gênica envolvida na biossíntese de PUFA pode ser modulada por meio

da regulação epigenética (BACKER et al., 2016). Existem evidências de que uma maior metilação do DNA entre os genes f*atty acid desaturase* (Fads1) e 2, modificam as atividades das enzimas de ácidos graxos humanos, dessaturases 5, e em menor grau a dessaturase 6 (HOWARD et al., 2014).

A atividade biológica do ALA ainda é pouco compreendida, e sua bioconversão em EPA e DHA é fortemente influenciada pelos níveis de ácido linoleico na dieta (BAKER et al., 2016). Portanto, a razão entre a ingestão diária de alimentos fontes de ácidos graxos ω-6 e ω-3 deve estar em equilíbrio (BURDGE, 2002). Portanto, é necessário continuar as investigações a respeito dos benefícios do ALA, assim como sua bioversão.

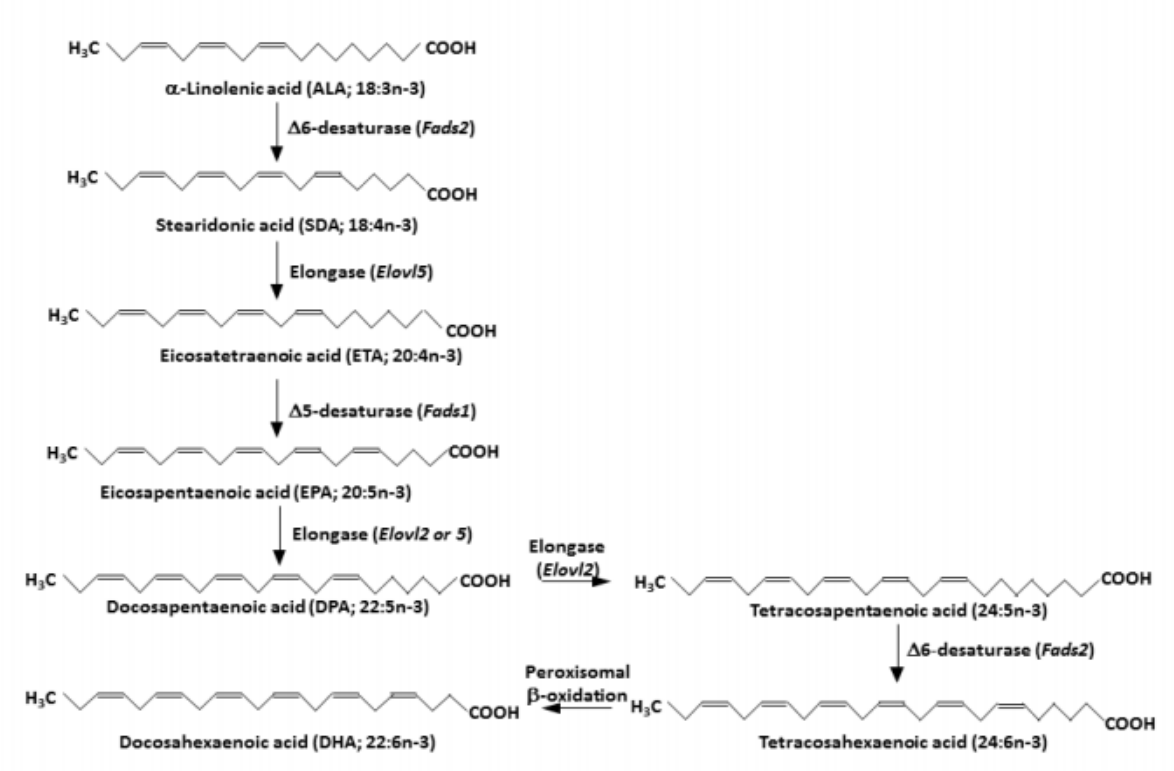

Figura 2. Bioconversão do ácido alfa-linolênico (ALA) (figura retirada de BAKER et al., 2016).

3.5. Chia: semente e óleo

A semente de chia (*Salvia hispanica* L.) é originada de uma planta herbácea pertencente à família *Lamiaceae*, nativa do sul do México e norte da Guatemala há milhares de anos (CAHILL, 2003; COATES; AYERZA 1996; IXTAINA, NOLASCO, TOMÁS, 2008). Atualmente, além desses países, é cultivada na Argentina, Peru, Paraguai, Equador, Nicarágua, Bolívia, Brasil e Austrália. Na Europa é cultivada em estufas (MUÑOZ et al., 2013; COATES, 2011). No Brasil, 61 espécies são cultivadas (HARLEY, 2012), e sua composição química e nutricional pode variar de acordo com a condição climática, localização geográfica, solo, nutrientes e ano de cultivo (AYERZA, COATES, 2010; DUBOIS et al., 2007; AYERZA; COATES, 2004). As sementes são ovais de 2 mm de comprimento e 1 mm de largura. A superfície da semente é lisa, e possui cores branca, cinza, marrom e preta (MUÑOZ et al., 2013; ALI et al., 2012). O óleo de chia é extraído por meio de prensagem a frio a partir da semente, e é comercializado como óleo bruto em vários países da América Latina e América do Norte, incluindo o Brasil (IXTAINA et al., 2011).

A semente de chia pode ser consumida inteira *in natura*, na forma de farinha, ingredientes em pães, bolos, barras de cereais, ou adicionada à alimentos, como iogurtes, saladas e frutas, e ainda pode ser utilizada como agente espessantes em molhos e sopas (BORNEO; AGUIRRE; LEÓN, 2010; JUSTO et al., 2007; MUÑOZ et al., 2012; VUKSAN et al., 2007; CAHILL, 2003).

A quantidade de nutrientes e seus compostos bioativos pode variar de acordo com os métodos de extração utilizados e locais de cultivo das sementes (TAGA et al., 1984; REYES-CAUDILLO et al., 2008; VÁZQUEZ-OVANDO et al., 2009; IXTAINA et al., 2011; CAPITANI et al., 2012, MARTÍNEZ-CRUZ; PAREDES-LÓPEZ, 2014).

3.5.1. Composição química da chia

A composição química da semente de chia é considerada de alto valor nutricional. Possui alto conteúdo de lipídios, proteínas, micronutrientes, fibras alimentares e compostos bioativos (Da SILVA et al., 2017; MARINELI et al., 2014; GRANCIERI; MARTINO; de MENJIA, 2019). Seu valor energético corresponde a 486 kcal/100g (USDA, 2011). A concentração de lipídios varia entre 25 e 39%, sendo considerada a fonte mais rica de ALA, com até aproximadamente 67%, e 19% do ácido linoléico (CAPITANI et al., 2012; AYERZA; COATES 2004; Da SILVA et al., 2017).

Possui elevada concentração de proteínas, que varia de 18 a 26% (GRANCIERI; MARTINO; de MENJIA, 2019; Da SILVA et al., 2017; AYERZA; COATES, 2004), sendo superior quando comparado a outras culturas tradicionais, tais como arroz (*Oryza sativa* L.), trigo, (*Triticum aestivum* L.), milho (*Zea mays* L.), aveia (*Avena sativa* L.) e cevada (*Hordeum vulgare* L.) (WEBER et al., 1991; IXTAINA et al., 2008). A semente de chia foi caracterizada como potencial fonte de peptídeos bioativos (SEGURA-CAMPOS et al., 2013; GRANCIERI; MARTINO; de MENJIA, 2019) e contém todos os aminoácidos essenciais (SANDOVAL-OLIVEROS; PEREDES-LÓPEZ, 2013).

A concentração de fibras alimentares da semente de chia varia entre 30 e 34% (Da SILVA et al., 2017; KULCZYŃSKI et al., 2019). Destas, aproximadamente 85-95% do conteúdo total é do tipo insolúvel, contendo principalmente lignina, celulose e hemicelulose (FERREIRA, 2013; VÁZQUEZ-OVANDO et al., 2010). Já a fibra alimentar solúvel é composta de mucilagem, contém xilose, glicose e ácido glicurônico metílico, que formam um polissacarídeo ramificado de alto peso molecular (LIN et al., 1994), responsáveis pela camada de gel quando embebida em água (REYES-CAUDILLO; TECANTE; VALDIVIA-LÓPEZ, 2008). Atualmente, a chia é a fonte que contém maior teor de fibras alimentares, ultrapassando a linhaça e cereais (KULCZYŃSKI et al., 2019).

Os micronutrientes presentes na semente de chia são cálcio (456-631 mg/100g), potássio (407-726 mg/100g), fósforo (860-919 mg/100g), ferro (7,72 mg/100g), zinco (4,58-5,68 mg/100g), magnésio (335-449 mg/100g), manganês (3,28 mg/100g), cobre (1,66 mg/100g), selênio (55,2 µg/100g), vitamina A (53,86 IU/100g), vitamina C-ácido ascórbico (1,61 mg/100g), tiamina (0,62 mg/100g),

riboflavina (0,2 mg/100g), niacina (8,83 mg/100g) e folato (49,0 μg/100g). (Da SILVA et al., 2017; USDA, 2011; MUÑOZ et al., 2013). A luteína, zeaxantina e astaxantina são carotenoides encontrados na semente (MARINELI et al., 2014). No óleo de chia há β-caroteno (0,53 mg/kg a 1,21 mg/kg) (IXTAINA et al., 2011) (TUBEROSO et al., 2007), e tocoferóis, como o α-tocoferol (8 mg / kg de lipídios), γ-tocoferol (422 mg / kg de lipídios) e δ-tocoferol (15 mg / kg de lipídios) (CIFTCI et al., 2012).

Em relação aos compostos fenólicos da chia, um estudo identificou, mas não quantificou extratos fenólicos brutos, tanto na semente de chia, na farinha de fibra e no óleo de chia (OLIVEIRA-ALVES et al., 2017). Exemplos desses fenólicos encontrados foram os ácidos orgânicos (ácido quinínico, ácido cítrico, ácido isocítrico); álcool fenólico (acetato de hidroxitirosol); ácidos hidroxicinâmicos (ácido caféico, ácido caféico-arabinósido, ácido danshensu – ácido hidrocaféico, ácido rosmarínico, ácido metil rosmarínico, ácido salvianólico C e E, ácido ferúlico, ácido cafeoilquínico); ácidos hidroxibenzóicos e hidroxibenzaldeído. No óleo de chia também foi identificado um diterpeno fenólico, o carnosol. De acordo com o cromatograma apresentado pelo estudo, observou-se um maior tempo de retenção das amostras do extrato oleoso, indicando que no óleo há mais compostos lipofílicos, como esperado. O extrato bruto apresentou mais compostos hidrofílicos em relação ao extrato do óleo e hidrolisado. O ácido ferúlico e hidroxitirosol acetato foram detectados apenas nas amostras hidrolisadas e podem ser responsáveis pelo aumento da atividade antioxidante nestes (OLIVEIRA-ALVES et al., 2017). Outros estudos também verificaram polifenóis na chia, como ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cinâmico, quercetina, miricetina, kaempferol, epicatequina, rutina, apigenina e ácido p-cumarico; e isoflavonas, como daidzeína, gliciteína, genisteína, genistina, e procianidinas A, B1, B2 e B3 (RAHMAN; CAMARGO; SHAHIDI, 2017; MARTÍNEZ-CRUZ; PAREDES-LÓPEZ, 2014; COELHO; SALAS-MELLADO, 2014; JIN et al., 2012).

3.5.2. Potencial funcional da semente, farinha e óleo de chia

A semente, a farinha e o óleo de chia, possuem alta capacidade antioxidante total, devido à presença de micronutrientes e compostos bioativos na matriz desses alimentos (GRANCIERI; MARTINO; de MENJIA, 2019; Da SILVA et al., 2017, MARINELI et al., 2015b). O consumo de fibras alimentares presentes na semente e farinha pode conferir saciedade, apresentando um potencial funcional, a qual reduz o risco de DCNT, e pode auxiliar no tratamento das mesmas (VUKSAN et al., 2010). A alta concentração do ω-3 na matriz alimentar da chia (CAPITANI et al., 2012), demonstra que a mesma é um bom alimento para reduzir a razão ω-6:ω-3 (FORTINO et al., 2017; CHICCO et al., 2009).

Os estudos com animais encontrados na literatura, demonstraram efeitos benéficos da chia na forma de semente, farinha e óleo (**Tabela 1**). A quantidade de semente ou farinha de chia ofertada nos estudos variaram entre 3% a 41,68%. Oito estudos com o óleo de chia utilizaram a quantidade entre 10% (RINCÓN-CERVERA et al., 2016; SIERRA et al., 2015; GONZÁLEZ-MAÑÁN et al., 2012), 4% (MARINELI et al., 2015a, MARINELI et al., 2015b) e 5,34% do óleo (AYERZA; COATES et al, 2007) e 3% (POUDYAL et al., 2013) e 0,15% (FONTE-FARIA et al., 2019). Dentre os estudos que investigaram o óleo de chia em modelo animal, apenas três utilizaram o modelo de dieta experimental *high fat and high fructose* (HFHF) para indução de alterações metabólicas (MARINELI et al., 2015a; MARINELI et al., 2015b; POUDYAL et al., 2013). Portanto, ainda são escassos estudos que avaliem o efeito do óleo de chia no controle de alterações metabólicas causadas por dietas HFHF.

Dentre os estudos com animais, nós destacamos os resultados que avaliaram o potencial efeito da chia na **adiposidade corporal** (FONTE-FARIA et al., 2019; FERREIRA et al., 2016; CREUS et al., 2016; OLIVA et al., 2013; POUDYAL et al., 2013; POUDYAL et al., 2012a; POUDYAL et al., 2012b; CHICCO et al., 2009); **parâmetros bioquímicos** (FONTE-FARIA et al., 2019; Da SILVA et al., 2018; De MIRANDA et al., 2018; FORTINO et al., 2017; FERREIRA et al., 2016; CREUS et al., 2016; MARINELI et al., 2015b; SIERRA et al., 2015; OLIVA et al., 2013; POUDYAL et al., 2013; GONZÁLEZ-MAÑÁN et al., 2012; POUDYAL et al., 2012a; POUDYAL et al., 2012b; CHICCO et al., 2009; AYERZA; COATES, 2007); **inflamação** (Da SILVA et al., 2018; FERREIRA et al., 2016; POUDYAL

et al., 2012b); **estresse oxidativo e resposta antioxidante** (FERREIRA et al., 2016; Da SILVA et al., 2018; FERREIRA et al., 2016; MARINELI et al.2015a; MARINELI et al., 2015b); e **avaliação hepática** (DA SILVA et al., 2018; FORTINO et al., 2017; CREUS et al., 2016; MARINELI et al., 2015b; POUDYAL et al., 2013; GONZÁLEZ-MAÑÁN et al., 2012; POUDYAL et al., 2012a; POUDYAL et al., 2012b; CHICCO et al., 2009) (**Tabela 1**).

A avaliação da adiposidade foi verificada em ratos Wistar machos suplementados com 36,2% (OLIVA et al., 2013; FERREIRA et al., 2016) e 5% (POUDYAL et al., 2012) de semente de chia durante 12 e 24 semanas, respectivamente. Ambos estudos verificaram redução do tecido adiposo epididimal (OLIVA et al., 2013), adiposidade visceral, tecidos adiposos retroperitoneal e omental (POUDYAL et al., 2012). No estudo de Marineli et al. (2015b), não houve redução do ganho de peso corporal e do acúmulo de gordura abdominal em ratos Wistar tratados com semente (13,3%) ou óleo de chia (4%). Um estudo realizado com camundongos C57BL/6 obesos alimentados com dieta hiperlipídica e suplementado com 0,15% de óleo de chia durante 7 semanas, verificou redução da massa gorda e aumento da massa magra nos animais (FONTE-FARIA et al., 2019).

A melhora da glicemia foi observada por CHICCO et al. (2009), que ofertaram 36,2% de semente de chia/Kg dieta rica em sacarose para ratos Wistar durante 20 semanas (CHICCO et al., 2009). Marineli et al. (2015a) também verificaram melhora na glicemia ocasionada pela semente e óleo de chia em ratos Wistar que receberam dietas ricas em gorduras saturadas (31%) e frutose (20%) (MARINELI et al., 2015a). A redução nos níveis séricos de insulina em jejum foi observada por FONTE-FARIA et al. (2019). Estudo realizado com camundongos *Swiss* que receberam dieta hiperlipídica com 30g de farinha de chia/Kg de dieta por 16 semanas, não alterou a tolerância à glicose dos animais (De MIRANDA et al., 2018). Isso pode indicar que a quantidade de chia ofertada e ou, a forma de administração de chia como farinha, possam ter sido insuficientes. Em vista disso, torna-se necessário continuar as investigações sob o metabolismo da glicose e possível quantidade ótima de chia na melhora do perfil glicêmico.

Houve aumento na capacidade antioxidante total (TAC) plasma (MARINELI et al., 2015a) na atividade antioxidante de enzimas antioxidantes, como SOD, CAT, GPx, GR (Da SILVA et al., 2018; Da SILVA et al., 2019;

MARINELI et al., 2015a; RINCÓN-CERVERA et al., 2017), e redução de EROs e da peroxidação lipídica (FERREIRA et al., 2016), redução de enzimas hepáticas, como aspartato aminotrasnferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (MARINELI et al., 2015b). Além disso, houve redução de enzimas envolvidas na lipogênese, como ACC (RINCÓN-CERVERA et al., 2017; FORTINO et al., 2017), redução da expressão de SREBP1c (RINCÓN-CERVERA et al., 2017); aumento da expressão do PPAR-α (Da SILVA et al., 2019; Da SILVA et al., 2018; RINCÓN-CERVERA et al., 2016), e do CPT-1 (FORTINO et al., 2017; RINCÓN-CERVERA et al., 2016).

A semente de chia ofertada em diferentes quantidades diferentes modelo de dieta experimental *high fat diet* (HFD) (Da SILVA et al., 2018 e Da SILVA et al., 2019), e dieta rica em sacarose (FERREIRA et al., 2016), demonstraram melhora nos marcadores relacionados à inflamação, observada pela redução dos níveis da citocina TNF (Da SILVA et al., 2018; FERREIRA et al., 2016), e da expressão do NF-κB no fígado (Da SILVA et al., 2018), da quantificação de IL-6 (FERREIRA et al., 2016) e IL-1β (Da SILVA et al., 2019) (**Tabela 1**). Contudo, nenhum estudou avaliou o efeito da chia na inflamação nos animais alimentados com dieta HFHF. Sendo assim, mais estudos são necessários a fim de explicar tais efeitos da chia sobre a inflamação sob o consumo de dietas ricas e gorduras saturadas e frutose.

Estudos de intervenção com humanos que avaliem o efeito da chia ainda são escassos. Vuksan et al. (2017) ofertaram 30 g/1000 kcal de semente de chia à pacientes com sobrepeso, e obesidade com DMT2, e não verificaram alterações significativas na glicemia em jejum e na hemoglobina glicada. Toscano et al. (2015) também não observaram melhora no perfil glicêmico em pacientes obesos e com sobrepeso com a quantidade de 35g de farinha de chia/dia. Ambos estudos verificaram redução no peso corporal e perímetro da cintura. Observou-se aumento de ácidos graxos poli-insaturado após o consumo entre 25 e 50 g de semente de chia por dia (NIEMAN et al., 2009, JIN et al., 2012; NIEMAN et al 2012; TOSCANO et al., 2015). A redução da inflamação em estudos com humanos foi observada pela diminuição da proteína C-reativa (PCR) e aumento nos níveis de adiponectina (VUKSAN et al., 2017) (**Tabela 2**).

Tabela 1. Potencial efeito da semente, farinha ou óleo de chia sob parâmetros metabólicos* em estudos com animais

Referência	Modelo animal	Dietas experimentais: Semente, farinha e óleo	Parâmetros metabólicos	Desfecho
FERNANDEZ-MARTÍNEZ et al. (2019)	Ratos Wistar machos	- Dieta padrão - 15% de semente de chia (SC) - Tiloxapol (TI) - TI + SC - Tetracloreto de carbono (CCl_4) - CCl_4 + SC - TI + CCl_4 + SC (4 semanas)	- Bioquímicos - Inflamação - Resposta antioxidante - Avaliação hepática	↓ TG e colesterol ↓ TNF plasma e fígado ↑ CAT ↓ ALT ↓ Peso do fígado
FONTE-FARIA et al. (2019)	Camundongos C57BL/6 machos	- Controle (n=8; 19 semanas) - Dieta hiperlipídica (HFD) (n=8; 19 semanas) - HFD + 0,15% óleo de chia (n=8; 7 semanas)	- Adiposidade - Bioquímicos	↓ Massa gorda corporal ↑ Massa magra corporal ↓ Resistência à insulina ↓ Insulina ↓ TG ↑ HDL
Da SILVA et al. (2019)	Ratas Wistar fêmeas	- Controle - Controle + farinha de chia (41,68%) - Dieta hiperlipídica (HFD) - HFD + farinha de chia (41,68%) n=8; 5 semanas	- Bioquímicos - Inflamação - Resposta antioxidante - Avaliação hepática	↓ Glicose ↓ LDL ↑ HDL ↓ IL-1β ↑ CAT ↑ Expressão PPAR-α

Continuação da Tabela 1. Potencial efeito da semente, farinha ou óleo de chia sob parâmetros metabólicos* em estudos com animais

Referência	Modelo animal	Dietas experimentais: Semente, farinha e óleo	Parâmetros metabólicos	Desfecho
Da SILVA et al. (2018)	Ratos Wistar machos	- Controle - Controle + farinha de chia (41,68%) - Dieta hiperlipídica (HFD) - HFD + farinha de chia (41,68%) n=8; 5 semanas	- Bioquímicos - Inflamação - Resposta antioxidante - Avaliação hepática	↓ Colesterol total, LDL, VLDL ↓ Leptina ↓ NF-κB (fígado) ↓ TNF e IL-10 ↑ SOD ↑ CAT ↑ Expressão PPAR-α
De MIRANDA et al. (2018)	Camundongos Swiss	- Controle (n=6; 16 semanas) - Controle + semente de chia (3%) (n=6; 16 semanas) - Dieta hiperlipídica (HFD) (n=6; 16 semanas) - HFD + farinha de chia (3%) (n=6; 16 semanas)	- Bioquímicos	↑ HDL
CREUS et al. (2017)	Ratos Wistar machos	- Controle (n=24; 24 semanas) - Dieta rica em sacarose (SRD) (n=24; 24 semanas) - SRD + semente de chia (36.2%) (n=12; 12 semanas)	- Bioquímicos	↓ Glicose (plasma) ↓ TG (plasma) ↓ AGL (plasma)
FORTINO et al. (2017)	Ratos Wistar machos	- Controle - Semente de chia (20%) (n=30; 20 semanas)	- Bioquímicos - Avaliação hepática	↓ TG e Colesterol total ↓ Razão ω6:ω3 ↓ Glicose ↑ Tolerância à glicose ↑ CPT-1 ↓ ACC

Continuação da Tabela 1. Potencial efeito da semente, farinha ou óleo de chia sob parâmetros metabólicos* em estudos com animais

Referência	Modelo animal	Dietas experimentais: Semente, farinha e óleo	Parâmetros metabólicos	Desfecho
FERREIRA et al. (2016)	Ratos Wistar machos	- Controle (n=24, 24 semans) - Dieta rica em sacarose (SRD) (n= 24, 24 semanas) - SRD + semente de chia (36.2%) (12 semanas)	- Adiposidade - Bioquímicos - Inflamação - Resposta antioxidante	↓ TA epididimal ↓ TG, AGL, ácido úrico ↓ ω-3:ω-6 ratio (plasma) ↓ Glucose ↓ TNF, IL-6 (plasma) ↓ TBARS; XO; PTN carbonil ↓ ROS; ↑ SOD e GPx ↑ Expressão Nrf2
RINCÓN-CERVERA et al. (2016)	Ratos Wistar machos	- Controle: 10% óleo de soja (1% ALA) - 10% Óleo de chia (10% ALA) n=12; 21 dias	- Enzimas antioxidantes - Avaliação hepática	↑ SOD, CAT, GPx, GR ↑ GSH; e Razão GSH/GSSG ↓ ACC ↑ CPT-1 ↑ ω-3 - ↓ SREBP-1c ↑ ω-3 - ↑ PPAR-α
MARINELI et al. (2015a)	Ratos Wistar machos	- Controle (n=6; 12 semanas) - HFHF (n=6; 12 semanas) - HFHF + 13,3% de semente de chia: curto (n=6; 6 semanas); longo (n=6; 12 semanas) - HFHF + 4% de óleo de chia: curto (n=6; 6 semanas); longo (n=6; 12 semanas)	- Estresse oxidativo - Resposta antioxidante	↑ TAC (plasma) ↑ CAT, GPx, GR, GSH (fígado e plasma) ↑ SOD e GSH (fígado) ↑ FRAP (fígado e plasma) ↓ TBARS (plasma) ↓ 8-isoprostane

Continuação da Tabela 1. Potencial efeito da semente, farinha ou óleo de chia sob parâmetros metabólicos* em estudos com animais

Referência	Modelo animal	Dietas experimentais: Semente, farinha e óleo	Parâmetros metabólicos	Desfecho
MARINELI et al. (2015b)	Ratos Wistar machos	- Controle (n=6; 12 semanas) - HFHF (n=6; 12 semanas) - HFHF + 13,3% de semente de chia: curto (n=6; 6 semanas); longo (n=6; 12 semanas) - HFHF + 4% de óleo de chia: curto (n=6; 6 semanas); longo (n=6; 12 semanas)	- Bioquímicos - Resposta antioxidante - Avaliação hepática	↓ RI ↑ TAC; SOD, GPx, CAT ↑ Expressão PGC-1α ↓ ALT e AST
SIERRA et al. (2015)	Coelhos Flandres híbridos	- Controle - Controle + 1% colesterol - 10% Óleo de chia + 1% de colesterol - 10% de Óleo de chia n=8; 5-6 semanas	- Bioquímicos	↓ TG (plasma) ↑ ALA (plasma)
OLIVA et al. (2013)	Ratos Wistar machos	- Dieta rica em sacarose (SRD) (n= 6; 24 semanas) - SRD + 36,2 % semente chia (n=6; 12 semanas)	- Adiposidade - Bioquímicos	↓ TA epididimal ↓ Glicose ↑ Tolerância à glicose ↓ TG (plasma) ↓ AGL (plasma) ↓ FAS
POUDYAL et al. (2013)	Ratos Wistar machos	- Controle (n=12; 8 semanas) - Controle + óleo de chia (3%) (8 semanas) - HFHF (n=12; 16 semanas) - HFHF (n=12; 16 semanas) seguida de HFHF + óleo de chia (3%) (8 semanas)	- Adiposidade - Avaliação hepática	↓ Adiposidade visceral; PC ↓ TA Retroperitoneal ↓ TG, colesterol total e AGL (plasma) ↓ RI ↓ Insulina ↑ Razão ω-3:ω-6 ↓ AST, LDH, ALP, CK ↓ Esteatose e peso do fígado

Continuação da Tabela 1. Potencial efeito da semente, farinha ou óleo de chia sob parâmetros metabólicos* em estudos com animais

Referência	Modelo animal	Dietas experimentais: Semente, farinha e óleo	Parâmetros metabólicos	Desfecho
GONZÁLEZ-MAÑÁN et al. (2012)	Ratos Sprague-Dawley	- Controle (10% óleo de girasol) - Dieta óleo de chia (10%) 21 dias	- Bioquímicos - Avaliação hepática	↑ ALA e EPA (plasma, fígado e TA) ↑ Expressão PPAR-α, ACOX1 e CAT-I ↓ Razão ω-3:ω-6
POUDYAL et al. (2012a)	Ratos Wistar machos	- Controle - Controle + semente de chia (5%) - HFHF - HFHF + semente de chia (5%) (n=12; 24 semanas)	- Adiposidade - Bioquímicos - Avaliação hepática	↓ Adiposidade visceral ↓ TA Retroperitoneal e omental ↑ TG; ↓ AGL (plasma) ↑ Razão ω-3:ω-6 (plasma e TA) ↓ Resistência à insulina ↓ ALT; ↑ ALP ↓ Esteatose hepatica
POUDYAL et al. (2012b)	Ratos Wistar machos	- Controle - Controle + semente de chia (5%) - HFHF - HFHF + semente de chia (5%) n=12; 8 semanas	- Adiposidade - Bioquimicos - Inflamação - Avaliação hepática	↓ Adiposidade visceral, ↓ Gordura total; PC; ↓ TA retroperitoneal e omental ↓ Massa gorda corporal ↑ Massa magra corporal ↓ RI ↑ Razão ω-3:ω-6 (plasma) ↓ PCR ↓ Ácido úrico; AST ↓ Fibrose hepática

Continuação da Tabela 1. Potencial efeito da semente, farinha ou óleo de chia sob parâmetros metabólicos* em estudos com animais

Referência	Modelo animal	Dietas experimentais: Semente, farinha e óleo	Parâmetros metabólicos	Desfecho
CHICCO et al. (2009)	Ratos Wistar machos	Fase I: - Controle (n=24; 3 semanas) - Dieta rica em sacarose (SRD) (n=24; 3 semanas) - SRD + Chia (n=24; 3 semanas) Fase II: - Controle (n=24; 12 semanas) - SRD (n=72; 12 semanas) dividido em três subgrupos: - Imediatamente eutanasiado (n=24) - SRD (n=24; seguido até 20 semanas); - SRD + chia (36,2%) (n=24; seguido até 20 semanas)	-Adiposidade - Bioquímicos - Avaliação hepática	↓ TA Epididimal ↓ TA Retroperitoneal ↓ TG, AGL, Colesterol total ↓ Glicose ↑ Tolerância à glicose ↑ ω-3 total; ↓ Razão ω6:ω-3 ↓ Esteatose hepática
AYERZA; COATES (2007)	Ratos Wistar machos	- Controle - Semente de chia (16%) - Semente de chia moída (16%) - Óleo de chia (5,34%) (n=8; 4 semanas)	- Bioquímicos	↓ TG ↓ AGS (plasma) ↑ HDL ↑ ω-3 (plasma) ↓ ω-6 ω-3

*Parâmetros metabólicos selecionados incluíram efeitos da chia na adiposidade, bioquímicos, Inflamação, estresse oxidativo e avaliação hepática em estudos com animais. ↑: aumento; ↓: redução; ACC: acetil-CoA carboxilase; ACOX1: acil-coenzima A oxidase 1 (ACOX1); AGL: ácidos graxos livres; ALA: ácido graxo α-linolênico; ALP: fosfatase alcalina; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; CAT: catalase; CAT-I: carnitina aciltransferase; CK: creatina quinase; CPT-1: Carnitina Palmitoil Transferase 1; FAS: ácido graxo sintase; FRAP: poder antioxidante redutor férrico; GPx: glutationa peroxidase; GR: glutationa redutase; GSH: glutationa S transferase; GSSG: glutationa S redutase; HDL: lipoproteína de alta densidade; HFD: dieta hiperlipídica; HFHF: dieta rica em gordura saturada e frutose; IL-10: interleucina-10; IL-1β: interleucina 1-beta; LDH: lactato desidrogenase; LDL: lipoproteína de baixa densidade; MDA: malondialdeído; NF-κB: fator de transcrição nuclear *kappa* B; PC: perímetro da cintura PCR: proteína C reativa; PGC1-α: coativador-1 alfa do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma; PPAR-α: receptor ativado por proliferador de peroxissoma-α; RI: resistência à insulina; SOD: superóxido dismutase; SRD: dieta rica em sacarose; SREBP1c: proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1c; TA: Tecido adiposo; TAC: capacidade antioxidante total; TBARS: método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; TG: triglicerídeo; TNF: fator de necrose tumoral; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; ω-3: ômega3; ω-6: ômega6.

Tabela 2. Potencial efeito da semente de chia em estudos com humanos

Referência	Modelo animal	Dietas experimentais: Semente, farinha e óleo	Parâmetros metabólicos	Desfecho
VUKSAN et al. (2017)	Duplo-cego n= 58 (18 homens e 40 mulheres com DMT2) Idade: 35-75 anos	- Controle 36g/1000 Kcal Farelo de aveia - Intervenção: 30g/1000Kcal farinha de chia 24 semanas	- Adiposidade - Bioquímicos - Inflamação	↓ Peso corporal ↓ Perímetro da cintura ↑ ALA ↑ PCR ↑ Adiponectina
TAVARES-TOSCANO et al. (2015)	Duplo-cego, placebo, controlado n= 26 (homens e mulheres) Idade: 35-65 anos	- Controle: 35 g de farelo de trigo - Intervenção: 35g de farinha de chia 12 semanas	- Peso corporal - Bioquímicos	↓ Peso corporal ↓ Perímetro da cintura ↓ Colesterol total ↓ VLDL ↑ HDL
TAVARES-TOSCANO et al. (2014)	Randomizado, duplo-cego, placebo, controlado = 26 (homens e mulheres) Idade: 35 – 65 anos Hipertensos grau I IMC: 25 - 35 kg/m²	- Controle: 35g de farinha de trigo - Intervenção: 35g farinha de chia 12 semanas	- Peso corporal	↓ Peso corporal
JIN et al. (2012)	Randomizado, controlado n= 10 (mulheres pós-menopausa; IMC > 35 kg/m² Idade: 53-60 anos	- Intervenção: 25g de semente de chia moída 7 semanas	- Bioquímicos	↑ Plasma ALA ↑ Plasma EPA

Continuação da Tabela 2. Potencial efeito da semente de chia em estudos com humanos

Referência	Modelo animal	Dietas experimentais: Semente, farinha e óleo	Parâmetros metabólicos	Desfecho
NIEMAN et al. (2012)	Randomizado, duplo-cego, placebo, controlado n= 62 (mulheres sobrepeso e pós-menopausa) Idade: 49-75 anos	- Controle: 25g semente de papoula - Intervenção: 25g de semente de chia - Intervenção: 25g de farinha de chia 10 semanas	- Bioquímicos	↑ Plasma ALA ↑ Plasma EPA
NIEMAN et al. (2009)	Randomizado, simples-cego, placebo, controlado n= 90 (homens e mulheres) Idade:20 – 70 anos IMC > 25 kg/m²	- Controle: 50g/dia (óleo de soja, óleo de girasol, fibra de cenoura, goma de tapioca - Intervenção: 50g de semente de chia 12 semanas	- Bioquímicos	↑ Plasma ALA
VUKSAN et al. (2007)	Randomizado, simples-cego, crossover n= 20 (11 homens - 9 mulheres) Idade: 56-72 anos T2DM e sobrepeso	- Intervenção: 15g farinha de chia/1000 Kcal - Controle: 15g farelo de trigo/1000 Kcal 12 semanas	- Bioquímicos - Inflamação	↑ ALA e EPA ↓ PCR

ALA: ácido alfa-linolênico; DMT2: diabetes *mellitus* tipo 2; EPA: ácido eicosapentaenoico; HDL: lipoproteína de alta densidade; IMC: Índice de massa corpórea; PCR: proteína C reativa; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Locais de execução

O ensaio biológico foi conduzido no Laboratório de Nutrição Experimental (LNE) do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS/UFV). As demais etapas foram realizadas em parceria com o Laboratório de Desenvolvimento de Novos Produtos (DNS/UFV), onde a matéria-prima semente de chia foi armazenada sob refrigeração à -18 ºC para seu posterior uso na dieta experimental e para obtenção do óleo de chia, o qual foi produzido no Laboratório de Química de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA/UFV). As demais análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos (LAA - DNS/UFV), Laboratórios de Análises Clínicas (LAC/DNS/UFV e da Divisão de Saúde/UFV), Laboratório de Biologia Estrutural (DBG/UFV), Laboratório MCDA do Departamento de Química (DEQ/UFV), e Laboratório de Biotecnologia e Pós-colheita de Macaúba do Departamento de Fitotecnia.

4.2. Semente de Chia

Foram utilizadas sementes de chia (*Salvia hispanica* L.) cultivadas no estado do Rio Grande do Sul (RS) Brasil, em janeiro de 2017 e colhidas no mesmo ano. As sementes apresentaram pericarpo marrom e diâmetro aproximado de 2,5 mm. Após a colheita, as sementes foram enviadas ao DNS/UFV e armazenadas no freezer à -18 ºC em embalagem à vácuo até o momento do preparo das dietas experimentais e, ou análises químicas da semente. As sementes foram trituradas em liquidificador (PHILIPS WALITA® - modelo RI2035 500W) em nível 4, por 2 minutos, semanalmente, no mesmo dia do preparo das dietas experimentais, e foram armazenadas à -18 º C, em embalagem a vácuo.

4.3. Obtenção do óleo de chia

O óleo da semente de chia foi produzido por meio de prensagem a frio das sementes previamente trituradas em liquidificador (PHILIPS WALITA®) modelo RI2035 500W, nível 4 por 2 minutos, e introduzidas em prensa mecânica hidráulica (Carver Laboratory Press, Modelo C 22400-36 - USA), a fim de extrair o óleo de chia. Posteriormente, o óleo foi imediatamente coletado, filtrado e centrifugado à 4100 rpm, por 15 min a 7 °C para purificação. Em seguida o óleo foi armazenado

em vidro âmbar com fotoproteção e acondicionado em freezer, com temperatura de congelamento a -80 º C, até o momento das análises de caracterização química, ou de sua utilização para o preparo das dietas experimentais. O óleo foi produzido semanalmente devido ao preparo semanal das dietas experimentais.

4.4. Composição centesimal da semente de chia

A determinação da composição centesimal foi avaliada utilizando os procedimentos analíticos preconizados pela *Association of official analytical chemistry* - AOAC (2012). A umidade foi determinada por gravimetria, utilizando estufa com circulação de ar (Nova Ética®, modelo 400 / 6ND, São Paulo, Brasil) a 105 °C por 12 horas. Para a determinação do conteúdo de cinzas, as amostras foram submetidas à incineração em mufla à 550 °C (Quimis, modelo Q320 M, Brasil). O teor de proteína foi determinado pelo método micro Kjeldahl por meio da quantificação de nitrogênio total (fator de conversão igual a 6,25) (AOAC, 2012; CAPITANI, 2012). A concentração de lipídios foi determinada por extração com solvente éter etílico com extrator em aparelho *Soxhlet* por 8 horas sob-refluxo. A quantificação de carboidratos foi realizada por meio da diferença entre o total da amostra e as concentrações de proteínas, lipídios, fibras alimentares, umidade e cinzas. O cálculo do valor calórico foi determinado pelos fatores de conversão de 4 $kcal.g^{-1}$ para carboidratos e proteínas e de 9 $kcal.g^{-1}$ para lipídios, expressos em $kcal.g^{-1}$. As concentrações de fibra alimentar total, fração solúvel e insolúvel foram determinadas pelo método enzimático gravimétrico (AOAC, 2012). A hidrólise enzimática foi realizada por meio das enzimas α-amilase termoresistente, protease e amiloglicosidase (Total Dietary Fiber Assay Kit, Sigma®). Para a filtração foram utilizados cadinhos de vidro com placa de vidro sintetizado com porosidade número 2 (ASTM 40-60mesh) e celite como auxiliar de filtração. A quantificação de fibra alimentar total foi obtida por meio da soma entre as frações solúvel e insolúvel. Todas as análises químicas foram realizadas em duplicata. Essas análises foram realizadas nos LAA e no LNE (DNS/UFV).

4.5. Determinação da capacidade antioxidante total da semente de chia

A preparação dos extratos foi realizada com dois gramas de chia, os quais foram adicionados a uma solução de 20 mL de acetona a 70% para a preparação

dos extratos. Em seguida, a suspensão foi agitada automaticamente (10 g, 2 horas, 25 ° C) e centrifugada (2865 g, 15 minutos) (Hermle®, modelo Z216MK, Alemanha). O sobrenadante foi transferido para um copo e volume foram completados para 20 mL com acetona a 70%. O extrato foi colocado em frasco âmbar e armazenado em freezer (-18 ± 1 ° C) até o momento da análise.

A metodologia descrita por Bloor (2001) foi utilizada para determinar a capacidade de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) na semente de chia. Em um tubo de ensaio, protegido da luz, 100 µL do extrato obtido foi adicionado a 1,5 mL de solução metanólica de DPPH (1,1-difenil-2-picrylhydrazyl) e agitada por vórtex (3000 rpm) por 30 segundos. Após 30 minutos, a absorbância da solução foi lida a 517 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific, 606 Evolution, USA). A curva analítica foi construída usando um Solução de 50-100 µmol / L trolox. A atividade anti-radical foi expressa em µmol equivalente trolox/g da amostra (µmol trolox / g).

4.6. Determinação do teor total de compostos fenólicos da semente de chia

O teor de fenólicos totais da semente de chia foi determinado de acordo com o método de Folin-Ciocalteau (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999). Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,5 mL de extrato, descrito no item anterior, e foi adicionado 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (20%). Após homogeneização, adicionou-se 0,5 mL de carbonato de sódio (7,5%). A mistura de reação foi homogeneizada em vórtex (2865 g, 10 segundos) e incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 765 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Evolution 606, USA). Foi utilizada curva analítica de ácido gálico (0,005-0,10 mg/mL) para quantificar os compostos. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/g de farinha de chia (mg GAE / g).

4.7. Perfil de ácidos graxos do óleo de chia

A composição dos ácidos graxos presentes no óleo de chia foi determinada por cromatografia gasosa proposto por Murrieta et al. (2003), adaptado para óleo vegetal. Em um tubo falcon, utilizou-se 100 µL da amostra do óleo de chia acrescido de 4 mL de solução a 0,5 mol/L de KOH em metanol, para catálise básica,

com duração de 30 minutos, tendo agitação em vórtex a cada 5 minutos. Após a reação adicionou-se 2 mL de água destilada. Adicionou-se aproximadamente 5 mL de hexano (Honeywell - Riedel-de Haen) para a extração dos ésteres metílicos de ácidos graxos (F.A.M.E.). Após a adição, a amostra foi centrifugada a 2500 rpm por 2 min (Centrífuga Quimis), e a fase orgânica foi coletada. Foi adicionado aproximadamente 0,3 g de sulfato de sódio anidro na fase orgânica para absorção da água remanescente, sendo o material filtrado em filtro seringa com membrana de Teflon (PTFE) (22 μm) e vertido para um tubo *vial*. Os ésteres metílicos foram analisados em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010 com injetor automático, por sistema de detecção por ionização em chama (FID), utilizando coluna capilar de sílica fundida SP-2560, com diâmetro interno da coluna de 0,18 mm e o tamanho de 75 m. A identificação dos ácidos graxos foi realizada por meio da comparação do tempo de retenção dos ácidos graxos das amostras e dos padrões de referência certificados (F.A.M.E. Mix C14-C22 - SUPELCO - USA), utilizando o hexano como solvente, e foi quantificado por meio das áreas dos picos do cromatograma. Esta análise foi realizada nos laboratórios MCDA do Departamento de Química e Laboratório de Biotecnologia e Pós-colheita de Macaúba do Departamento de Fitotecnia (UFV).

4.8. Índice de peróxido do óleo de chia

O índice de peróxido é utilizado para avaliar oxidação do óleo. A determinação do índice de peróxido do óleo de chia foi realizada de acordo com os procedimentos preconizados pelo AOCS, 1990 (AMERICAN OIL CHEMISTS´ SOCIETY, 1990), na qual baseia-se na oxidação do iodo na presença de iodeto de potássio pelos peróxidos presentes na amostra, assumindo que todas as substâncias oxidantes na amostra são peróxidos. O resultado foi expresso como miliequivalentes (mEq) de peróxido/1000g amostra, calculado pela fórmula: [(A-B) x N x FC x 1000 / p], onde A: solução de tiossulfato de sódio 0,1 mL gasto na titulação da amostra, B: solução de tiossulfato de sódio 0,1 mL gasto na titulação do branco; N: normalidade da solução de tiossulfato de sódio; FC: fator de correção da solução de tiossulfato de sódio; p: peso da amostra (g).

4.9. Acidez do óleo de chia

O índice de acidez é usado para avaliação do estado de conservação do óleo, por meio da rancidez hidrolítica, e definido como o número de mg de hidróxido de potássio (KOH) necessário para neutralizar um grama da amostra (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Para a análise, utilizou-se 2 g de amostra do óleo de chia em triplicata, e foi adicionado 25 mL de solução de éter-álcool (2:1) neutra, e adicionado duas gotas do indicador fenolftaleína. A titulação foi realizada com solução de hidróxido de sódio 0,1 M até o aparecimento da coloração rósea, a qual persistiu por 30 segundos. O resultado foi expresso por mg de KOH/g de óleo (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.10. Ensaio biológico

4.10.1. Animais

Foram utilizados 40 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) entre 45 e 50 dias de idade obtidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV. Os animais foram alocados em gaiolas individuais de aço inoxidável, mantidos em ambiente com temperatura controlada a 22 ºC ± 2 ºC, com ciclo claro-escuro (12/12h). Em todas as fases do experimento os animais receberam dieta e água *ad libitum*. Essa etapa foi realizada no biotério setorial do LNE. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/ UFV), com número de protocolo 89/2018 (ANEXO I), e todos os procedimentos experimentais foram realizados em consonância com os princípios éticos na experimentação animal.

4.10.2. Cálculo amostral

Para calcular o número de repetições estimado utilizou-se o cálculo do número amostral (“n”) para estudos descritivos conforme detalhado por Fontelles et al. (2010), por meio da equação:

$$n = \frac{s^2}{(\overline{x} - \mu)^2} X \left(z_{\frac{\alpha}{2}}\right)^2$$

Onde:

n: número de animais por grupo

s^2 : variância dos dados de referência

$\overline{x} - \mu$: diferença máxima razoável, admitida entre a média obtida da amostra e a verdadeira média da população.

$z\frac{\alpha}{2}$: Erro alfa do tipo I: determinado por meio da tabela de valores críticos da distribuição normal gaussiana.

Não foi realizado experimento prévio para cálculo do número de repetições ideal, pois seria necessário a utilização de animais. Portanto, utilizou-se dados de estudo prévio (MARINELI et al., 2015a), que induziu alterações metabólicas nos animais por meio do consumo de dieta rica em gordura saturada e frutose, e o cálculo foi realizado a fim de confirmar o número de animais. Utilizou-se os valores de ganho de peso dos animais

Considerou-se α=5%, e portanto um $z\frac{\alpha}{2}$ =1.96, conforme utilizado nos estudos de saúde (FONTELLES et al., 2010).

$$n = \frac{s^2}{(\overline{x}-\mu)^2} \text{ X } (z_{\frac{\alpha}{2}})^2 =$$

$$n = \frac{(7{,}83)^2}{5} \text{ X } 1.96^2 = \textbf{9,42 animais/grupo}$$

Portanto, fez-se necessário 40 animais, uma vez que o estudo contou com 4 grupos experimentais.

4.10.3. Delineamento experimental

O experimento foi dividido em dois períodos. Primeiramente, houve indução de alterações metabólicas por meio do consumo de dieta rica em gordura saturada e frutose (do inglês: *high fat high fructose diet* – HFHF) com duração de 8 semanas, na qual os animais foram divididos em dois grupos experimentais que receberam: dieta controle normal (grupo AIN-93M; n=10) (REEVES et al.,1993), e o grupo HFHF (n=30) que recebeu dieta HFHF (MARINELI et al., 2015a). Ao final do período, todos os animais foram mantidos em jejum de 12 horas e foi realizada avaliação da concentração de glicose e triglicerídeo por meio de punção da veia caudal com tiras reativas ACCU-CHEK® Active e ACCUTREND® GCT, respectivamente. Não houve diferença da glicemia e do triglicerídeo basal entre os grupos experimentais (p> 0,05) (**Tabela 3**). Também foram mensurados o

perímetro abdominal no ponto de maior circunferência abdominal, e a circunferência nasoanal (CNA), medido da região anal até o nariz do animal com fita métrica inelástica, para o cálculo do índice de Lee, por meio da equação: $\sqrt[3]{\boldsymbol{P}\ (\boldsymbol{g})}$/CNA (cm) x 1000.

Tabela 3: Variáveis bioquímicas de ratos Wistar induzidos a alterações metabólicas com dieta HFHF durante 8 semanas.

Variáveis	AIN93-M	HFHF
Glicemia basal (mg/dL)	88,00 ± 11,60 [a]	99,83 ± 18,30 [a]
TG basal (mg/dL)	116,70 ± 7,96 [a]	111,15 ± 15,39 [a]

Animais alimentados com dieta padrão (AIN-93M); e dieta rica em gordura saturada e frutose (HFHF) ao final da fase de indução de alterações metabólicas, antes de iniciar a fase de tratamentos com as dietas testes, semente e óleo de chia. Os valores são representados pelas médias e desvio padrão (n=8). As médias dos grupos foram analisadas pelo teste *t* não pareado a 5% de probabilidade. Letras iguais indicam médias sem diferença estatística (p> 0,05).

Após as 8 semanas do período de indução de alterações metabólicas, iniciou-se o tratamento com duração de mais 10 semanas (adaptado de MARINELI et al., 2015a). Os animais do grupo controle normal (AIN93-M) foram mantidos com a mesma dieta AIN-93M (n=10), enquanto que os demais do grupo HFHF foram randomizados de forma não aleatória por meio do peso corporal a fim de manter a homogeneidade entre os três grupos. Assim, esses grupos foram dispostos da seguinte maneira: dieta rica em gordura saturada e frutose (HFHF) - controle positivo (grupo HFHF n=10); dieta semente de chia: dieta HFHF com substituição do óleo de soja pelo lipídio proveniente da semente de chia (grupo SC; n=10); e dieta óleo de chia: dieta HFHF com substituição do óleo de soja pelo lipídio proveniente do óleo de chia (grupo OC; n=10) (**Figura 3**).

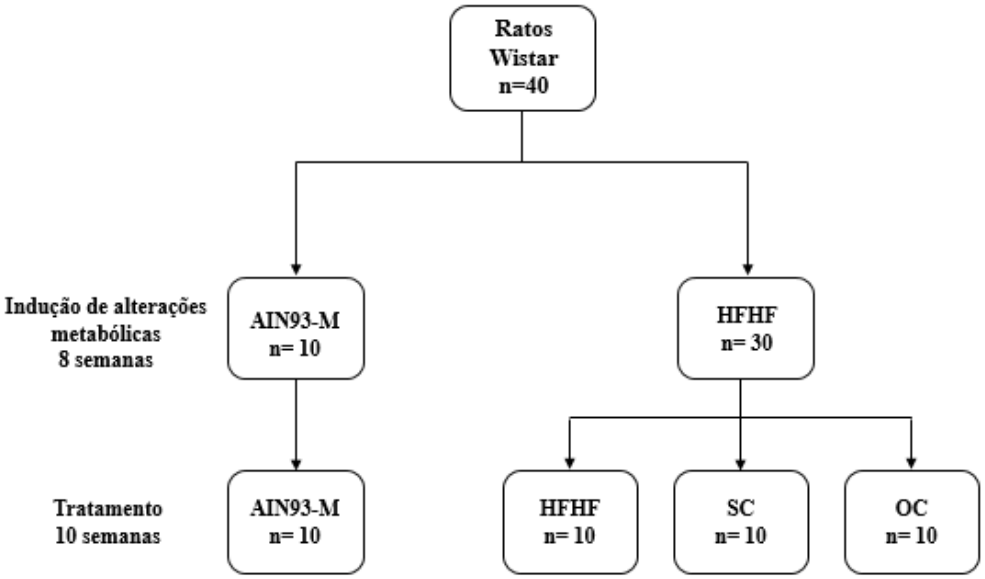

Figura 3. Desenho experimental
Indução de alterações metabólicas: grupo controle normal (n=10) recebendo dieta padrão para roedores (AIN93-M); e grupo induzido a alterações metabólicas por meio de dieta rica em gordura saturada (31%) e frutose (20%) (do inglês: *high fat high fructose diet* – grupo HFHF; n=30) com duração de oito semanas. O período de tratamento durou mais dez semanas e foi composto por quatro grupos experimentais (n=10), os quais receberam dieta padrão (grupo AIN93-M - controle normal); dieta HFHF (controle positivo); dieta semente de chia (SC): dieta HFHF com substituição de 4% de óleo de soja para lipídio proveniente da semente de chia (equivalente a 14,73% na dieta de semente de chia); e dieta óleo de chia (grupo OC): dieta HFHF com substituição de 4% do óleo de soja para lipídio proveniente de óleo de chia (equivalente a 4% na dieta de óleo de chia)

4.10.4. Dietas Experimentais

As dietas experimentais do grupo AIN93-M (controle normal) e do grupo HFHF (controle positivo) foram elaboradas, respectivamente, de acordo com Reeves et al. (1993) e Marineli et al. (2015a). O grupo HFHF recebeu dieta com conteúdo aumentado de lipídios, sendo 4% de óleo de soja, mais 31% de banha de porco, além de 20% de frutose (MARINELI et al., 2015a) (**Tabela 4**). As dietas testes foram preparadas de acordo com a dieta HFHF e para o cálculo das quantidades de semente e do óleo de chia, levou-se em conta a composição química da semente de chia (**Tabela 5**). Houve substituição do tipo de lipídio na dieta dos grupos tratamentos, sendo os 4% do óleo de soja da dieta HFHF totalmente substituído pela mesma percentagem de óleo de chia (grupo OC). Para o grupo SC, foi utilizado 4% de lipídio proveniente da semente de chia, o qual correspondeu a 14,73% de semente (**Tabela 5**). Para a adequação da fibra alimentar das dietas, levou-se em consideração a semente de chia, na qual 14,73% de semente ofertou

5,58% de fibra alimentar. Esta quantidade de fibra alimentar foi ajustada com celulose para as demais dietas experimentais (**Tabela 4**).

Tabela 4. Composição das dietas experimentais (g/Kg)

Ingredientes	**AIN93-M**	**HFHF**	**SC**	**OC**
Albumina*	136,6	136,60	101,81	136,36
Amido de milho	463,54	135,00	116,85	135,00
Amido Dextrinizado	155,00	45,00	45,40	45,00
Sacarose	100,00	28,64	29,32	28,64
Banha de porco	-	310,00	310,00	310,00
Óleo de Soja	40,00	40,00	-	-
Óleo de Chia	-	-	-	40,00
Semente de Chia	-	-	147,32	-
Frutose	-	200,00	200,00	200,00
Celulose	55,80	55,80	-	55,80
Mix Mineral	35,00	35,00	35,00	35,00
Mix Vitamínico	10,00	10,00	10,00	10,00
L-cistina	1,80	1,80	1,80	1,80
Bitartarato de Colina	2,50	2,50	2,50	2,50
Distribuição das dietas				
ω-3** (g/Kg)	3,28	10,19	31,83	31,83
ω-6** (g/Kg)	20,24	58,77	46,49	46,49
Razão ω-6:ω-3	6,17:1	5,77:1	1,46:1	1,46:1
Macronutrientes				
Carboidrato (%)	76	31	31	30,2
Proteína (%)	13,8	9,2	9,2	9,3
Lipídio (%)	10,1	59,9	59,9	60,5
Densidade calórica (kcal/g)	3,55	5,26	5,26	5,21

Composição das dietas experimentais baseada na dieta padrão para roedores (AIN-93M) (REEVS et al., 1993); Dieta HFHF: rica em gordura saturada e frutose (MARINELI et al., 2015a); dieta teste semente de chia (SC): dieta HFHF adicionada de semente de chia baseada em sua composição centesimal (g/100g): carboidrato, 3,18g, fibra alimentar total: 37,91g; fibra alimentar solúvel: 3,43g; fibra alimentar insolúvel: 34,48g; umidade 6,86g; cinzas: 4,15g; proteína: 20,67g); e dieta teste óleo de chia: dieta HFHF com substituição de 4% do óleo de soja para o óleo de chia. *Albumina baseada no teor de 88% de proteína. **Baseado no perfil de ácidos graxos do óleo de chia obtido em nosso estudo. ω-3: ômega-3; ômega-6.

A quantidade estimada de ω-3 advindos da semente e do óleo de chia foi de 24,92 g/Kg de dieta, e de ω-6, 7,96 g/Kg de dieta, de acordo com o perfil de ácidos graxos do óleo de chia do nosso estudo. Enquanto que o ω-3 estimado proveniente da banha de porco contém 6,91 g/Kg de dieta, e de ω-6, 38,53 g/Kg de dieta (FONSECA; GUTIERREZ, 1974). O ω-3 estimado no óleo de soja foi de 3,28 de g/Kg de dieta, e de ω-6, 20,24 g/Kg de dieta (FONSECA; GUTIERREZ, 1974) (**Tabela 4**).

Todos os ingredientes foram pesados em balança semi-analítica (Gehaca, BG2000, Brasil), misturados manualmente, peneirados em peneiras de plástico e homogeneizados em batedeira industrial (Leme) durante 15 minutos. Após o preparo, as dietas foram acondicionadas em sacos escuros de polietileno, devidamente rotulados e armazenados em freezer (-18 ºC ± 1 ºC), de modo a minimizar a oxidação de ácidos graxos.

4.10.5. Eutanásia

Após 10 semanas de tratamento, os animais foram anestesiados com isoflurano inalatório a 5% (Isoforine, Cristália®), sem período de jejum, e em seguida, eutanasiados por punção cardíaca. O sangue foi coletado em tubos anticoagulante EDTA para análises do hemograma, assim como anticoagulante com heparina para coleta do plasma para análises bioquímicas. Após a coleta, os tubos foram centrifugados a 2865 rpm por 10 minutos para separação do plasma. Os tecidos adiposos epididimal, visceral e retroperitoneal, foram coletados, assim como o fígado, e lavados em solução salina (PBS). Posteriormente, os mesmos foram pesados e imediatamente imersos em nitrogênio líquido. Os órgãos foram armazenados a -80 ºC para posteriores análises. Especificamente com relação ao fígado, um fragmento do órgão foi recolhido e fixado em formaldeído a 10%. Após 48 horas, o fixador foi descartado e adicionado álcool 70%. Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente para posterior análises histológicas.

4.10.6. Dados biométricos e consumo alimentar

As medidas biométricas e dados do consumo alimentar dos animais foram obtidos semanalmente (n=10). O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi obtido por meio da fórmula: CEA% = (Ganho de peso corporal final (g) / Consumo de dieta (g)) x 100), enquanto que o coeficiente de eficiência energética (CEE) foi obtido por meio do ganho de peso corporal final, dividido pelo consumo total de dieta (g) multiplicado pela densidade calórica das respectivas dietas experimentais. Ao final do experimento foram mensuradas com fita métrica inelástica, as medidas do perímetro abdominal no ponto de maior circunferência, e o comprimento nasoanal (CNA), medido da região anal até o nariz do animal, para o cálculo do índice de Lee, por meio da equação: $\sqrt[3]{P\ (g)}$/CNA (cm) x 1000. O índice

hepatossomático foi calculado pela relação entre o peso do fígado e o peso corporal total, multiplicado por 100.A adiposidade corporal total (%) foi calculada por meio da soma dos tecidos adiposos (epididimal, abdominal e retroperitoneal), dividido pelo peso corporal final, multiplicado por 100.

4.11. Análises bioquímicas

A concentração de glicose e triglicerídeos foi realizada por meio da punção da veia caudal ao final do tratamento. Os animais foram mantidos em jejum de 12 horas e foi coletado sangue por punção caudal, por meio do monitor de medição ACCU-CHEK® Active e fitas específicas de acordo com as instruções do fabricante (Roche) para detecção da concentração de glicose e para o triglicerídeo utilizou-se o equipamento ACCUTREND® GCT de acordo com as instruções do fabricante (ACCUTREND®). A análise do leucograma foi realizada por meio das amostras de sangue dos animais que gerou dados de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, plaquetas, razão plaquetas linfócitos, e razão neutrófilo linfócito. As concentrações plasmáticas de ácido úrico e das enzimas AST, ALT foram avaliadas após a eutanásia dos animais, de acordo com o método colorimétrico (Bioclin).

4.12. Preparo do homogenato do fígado

Para a obtenção do homogenato do fígado, pesou-se cerca de 200 mg do órgão em microtubos de 1,5 mL. Em seguida, o conteúdo foi macerado utilizando-se pistilo e homogeneizado com 800 µL de solução-tampão fosfato de sódio 50mM, contendo 1 mM EDTA (pH 7,4). Esta concentração de homogenato (1:5) do fígado foi utilizada para as análises de quantificação das citocinas TNF e IL-10, MDA e TAC. Para as análises das enzimas antioxidantes SOD e CAT, utilizou-se outro homogenato do fígado na concentração de diluição 1:10 (tecido/tampão). As amostras foram centrifugadas à 10.000 *g* por 10 min à 4 ºC, e o sobrenadante recolhido. As amostras foram armazenadas em ultra-freezer (-80 ºC) até o momento das análises e durante, as mesmas foram mantidas sob refrigeração (-5 ºC).

4.12.1. Determinação do teor de proteína total do fígado

Esta análise da quantificação de proteína foi realizada para expressar os resultados das atividades das enzimas antioxidantes (SOD e CAT), marcador de

peroxidação lipídica MDA. A determinação de proteínas totais no homogenato do fígado foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976). Para esta análise, 10 mL de homogenato do fígado diluídos 1:5 e 1:10, foram adicionados de 790 µL de água destilada e 200 µL do reagente de Bradford. A albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada para a curva padrão de proteína. A leitura foi realizada após 15 min da adição do reagente *Bradford* à 595 nm no espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientifics; Waltham, MA, EUA).

4.12.2. Malondialdeído (MDA)

O MDA é um aldeído reativo, de baixa estabilidade, amplamente utilizado como biomarcador na avaliação do estresse oxidativo, o qual determina a extensão da reação de peroxidação lipídica, que se forma a partir da degradação de ácidos graxos poliinsaturados (PILZ; MEINEKE; GLEITER, 2000). Para esta análise, utilizou-se o método de Buege e Aust (1978), que é realizado por meio da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O TBARS forma produtos de cor rosa como peróxidos lipídicos, hidroperóxido e duplas ligações de oxigênio (BUEGE; AUST, 1978). Foram pipetados 400 µL do homogenato do fígado, 400 µL de solução de TBARS (ácido tricloroacético 15% (p/v), e ácido tiobarbitúrico 0,375% (p/v) e HCl 0,25 M. Após agitação em vórtex por 10 segundos, as misturas foram incubadas à 90 °C em banho-maria por 40 min, seguindo-se da adição de 600 µL de n-butanol. Os tubos foram agitados por 2 min, centrifugados (5 min a 3500 rpm), sendo o sobrenadante coletado e transferido para placa de ELISA. Os valores finais foram calculados por meio do coeficiente de absortividade molar ($1{,}56x10^5$). O branco da reação foi obtido por meio da adição de todos os reagentes do procedimento, exceto a amostra, que foi substituída por 400 µL de tampão fosfato. A leitura foi realizada no comprimento de onda a 535 nm em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientifics; Waltham, MA, EUA). Os resultados foram expressos em nmol de MDA/mg de proteína.

4.12.3. Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD foi estimada utilizando-se a metodologia descrita por Marklund (1985), na qual ânions superóxido são gerados durante a oxidação do pirogalol, e a enzima SOD inibe a sua oxidação. Foram pipetadas em duplicata em uma placa de ELISA de 96 poços 30 µL de homogeneizado do fígado, 30 µL de pirogalol (120 mM), 12 µL de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difeniltetrazolio a 6,25mM) e 129 µL de tampão tris-EDTA (pH 7,4) para cada reação. O branco foi preparado a partir da combinação de 159 µL de tampão fosfato EDTA pH 7,4 e 12 µL de MTT. Após incubação a 37 ºC por 5 minutos, foi realizada a leitura de absorbância a 570 nm em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientifics; Waltham, MA, EUA). Uma unidade de atividade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 50% de inibição da auto-oxidação do pirogalol sob as condições de teste e expressa como U de SOD/mg proteína.

4.12.3. Catalase (CAT)

A determinação da atividade da enzima CAT é baseada na sua capacidade em clivar o H_2O_2 em água e oxigênio molecular conforme descrito por Aebi (1984). A análise foi realizada em duplicata da amostra, contendo em um microtubo (1,5 mL) 10 µL do homogenato de fígado (1:10) diluído 5 vezes, e 1 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) adicionado de H_2O_2 (25 mL de tampão fosfato PBS 100 mM, pH 7,4, para 40 µL de H_2O_2 30%). Antes de cada reação, para o branco, foram utilizados 10 µL de amostra adicionada de 1 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,4). As absorbâncias foram determinadas em uma cubeta semi-micro de quartzo (1,5 mL) nos tempos 0, 30, 60 segundos a 240 nm em espectrofotômetro (Modelo T70 + UV / VIS - PG Instruments Ltd). Uma unidade (U) de CAT é equivalente a hidrólise de 1 mol de H_2O_2 (ε=39,4 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$) por minuto. A absorbância utilizada para o cálculo foi o delta obtido da absorbância inicial (tempo 0) subtraído da absorbância a 60 segundos, medida em espectrofotômetro. O resultado final foi multiplicado pela constante 2,361 e os dados foram expressos em U de CAT/mg de proteína.

4.12.4. Óxido nítrico (NO)

A concentração de NO foi determinada pelo método de Griess (GREEN et al, 1982). O reagente de Griess é uma mistura 1:1 de 1% de sulfanilamida (I) e 0,1% de naftiletilenodiamino-bicloridrato (II) em ácido ortofosfórico (H_3PO_4) a 2,5%. No momento do ensaio, foram misturadas 50 µL da solução I e 50 µL da solução II formando o reagente de Griess. As amostras (50 µL do homogeneizado de fígado) foram pipetadas em triplicata em uma placa ELISA de 96 poços. Em seguida, um volume de 100 µL de reagente Griess foi adicionado em todos os poços. Após incubar por 10 minutos em ambiente escuro, a densidade óptica foi medida em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientifics; Waltham, MA, EUA) a 570 nm. As concentrações de NO foram calculadas a partir de uma curva-padrão realizada com uma solução de 6,9 mg de nitrito de sódio ($NaNO_2$) em 400 mL de tampão fosfato (pH 7,4) expressos em µM. Os valores da concentração utilizados para o cálculo da curva-padrão de $NaNO_2$ variaram de 100 a 0 µM.

4.12.5. Capacidade Antioxidante Total (TAC)

A determinação da TAC foi realizada no plasma e no homogenato do fígado dos animais, por meio do *kit* comercial *antioxidant assay kit* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) seguindo-se as especificações do fabricante. O volume de 10 µL de cada amostra foi transferido para placa de 96-poços, seguindo-se da adição de 20 µL de solução contendo mioglobina. Após esta etapa, 150 µL do substrato ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína)-6-sulfônico (ABTS) foram adicionados a cada poço e a placa então incubada por 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, 100 µL da solução de parada foram adicionados em cada poço e os valores de absorbância a 450 nm obtidos em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientifics; Waltham, MA, EUA). A concentração de TAC foi calculada após a obtenção de uma curva padrão com quatro parâmetros utilizando-se concentrações conhecidas de Trolox (0, 0.015, 0.045, 0.105, 0.21 and 0.42 mM).

4.12.6. Citocinas

As citocinas TNF e IL-10 foram quantificadas no homogenato do fígado dos animais por meio de ensaios imunoenzimáticos com *kits* de ELISA. Para mensuração de TNF foi utilizado o *kit Rat TNF alpha Uncoated* ELISA (Invitrogen,

Austria), seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, 100 µL do anticorpo de captura específico para TNF foi transferido para placa de 96-poços, a qual foi selada e incubada *overnight* à 4 °C para máxima sensibilidade. Após este período, os poços foram lavados 3 vezes com 250 µL de tampão de lavagem (PBS 1X) e secos com papel absorvente para eliminar qualquer tampão residual. Após esta etapa, 100 µL do homogenato do fígado foi adicionado a todos os poços destinados às amostras, enquanto os padrões foram pipetados em diluição seriada. 100 µL do anticorpo de detecção foi incubado por 2 horas. Após aspiração e lavagem dos poços (3 vezes PBS 1X), foram adicionados 100 µL da enzima peroxidase conjugada com avidina em cada poço e a placa incubada por 30 minutos. Por fim, após cinco lavagens com PBS 1X, 100 µL de substrato enzimático TMB foram adicionados e, após posterior incubação por 15 minutos, paralisada com a adição do mesmo volume de solução de parada (1 M H_3PO_4). A leitura foi realizada no espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientifics; Waltham, MA, EUA) utilizando-se o comprimento de onda de 450 nm. A quantidade de TNF foi calculada após interpolação dos valores obtidos por meio de uma curva padrão.

A quantificação de IL-10 foi realizada por meio do *kit Rat IL-10 (Interleukin 10)* ELISA (Elabscience, USA) seguindo-se as recomendações do fabricante. Brevemente, 100 µL do homogenato do fígado foi transferido para placa de 96-poços previamente tratada com anticorpos de captura específicos para IL-10 de ratos. A placa foi selada e incubada à 37 °C por 90 minutos. Após este período, o líquido dos poços foi removido e a eles adicionada a alíquota de 100 µL de uma solução contendo anticorpos de detecção, permanecendo a placa incubada à 37 °C por 1 hora. Após aspiração e lavagem dos poços por três vezes com a solução de lavagem, 100 µL da enzima peroxidase conjugada com avidina foram adicionadas em cada poço e a placa incubada por 30 minutos à 37 °C. Finalmente, após cinco lavagens com a solução de lavagem, a alíquota de 90 µL de substrato enzimático TMB foi adicionada, incubada por 15 minutos a 37 °C, e paralisada após adição de 50 µL de solução de parada. A leitura foi realizada à 450 nm no espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientifics; Waltham, MA, EUA), e a concentração de IL-10 foi calculada por meio de curva padrão.

4.13. Análises histomorfométricas do fígado

Para a microtomia foi utilizado um micrótomo rotativo automático (Leica ®M2255) e navalhas de vidro (Leica). Foram obtidos cortes semi seriados de 3 μm de espessura, respeitando-se a distância de 12 cortes entre eles. As preparações foram coradas com tricrômico de gomori para as análises histomorfométricas, sendo fotografadas em um microscópio de campo claro (Olympus AX 70 TRF, Tokyo, Japan). Foram realizadas contagem e medição do diâmetro do hepatócito, infiltrado inflamatório, densidade volumétrica dos componentes hepáticos, núcleo, citoplasma e vesículas lipídicas, microvascularização, e núcleo de outras células. Utilizou-se também a coloração de picrosirius para análise do colágeno tipo I, III e total, sendo as lâminas fotografadas em microscópio de luz com um filtro polarizador acoplado a um analisador de imagem. Para esta coloração, foram selecionados 10 campos do fígado para cada animal. Para todas as análises histológicas, utilizou-se o *software* Image J® 1.48v (National Institute of Health, USA), em um campo histológico com retículo de 266 pontos sobre as imagens até atingir o somatório de 1064 pontos por animal em um aumento de 20x (CUPERTINO et al., 2013). O grau de esteatose foi avaliado semiquantitativamente de acordo com uma escala de 5 graus: grau 0, se o percentual de gordura fosse ausente ou menor que 5%; Grau 1, se ≥ 5% e <25%; Grau 2, se ≥ 25% e <50%; Grau 3, se ≥ 50% e <75%; e grau 4, se ≥ 75% (TURLIN et al., 2001).

4.14. Análises estatísticas

Os dados foram expressos em médias ± desvio padrão. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram transformados por transformação logarítmica antes das análises estatísticas paramétricas, sendo que, para os dados não paramétricos foi utilizado Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post-hoc* Dunn´s. Para a análise dos dados paramétricos, foi utilizado a análise de variância One-way (ANOVA) e as diferenças das médias dos grupos foram comparadas pelo teste *post-hoc* Newman-Keuls. Foi considerado um nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas e gráficos foram realizados por meio do programa *Graphpad Prism* versão 6.0 (San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Composição química da semente e do óleo de chia.

A composição dos macronutrientes carboidratos, proteínas e lipídios na semente de chia foi de 3,18%, 20,67% e 27,15%, respectivamente. Do componente lipídico total do óleo de chia, 10,3% são gorduras saturadas, 7,5% monoinsaturadas, e 82,2% de poli-insaturadas. A umidade foi 6,86% e cinzas, 4,15%. A fibra alimentar total foi 37,91%, sendo 34,48% de fibra alimentar insolúvel e 3,43% de fibra alimentar solúvel. O conteúdo de fenólicos da semente de chia foi 1,39 mg GAE/g e a capacidade antioxidante total da semente de chia 4,36 µmol trolox/g. A média do rendimento da eficiência de extração do óleo por meio da prensagem à frio foi de 8%. O índice de peróxido do óleo de chia foi de 1,88 mqE, e sua acidez 3,77 mg KOH/g. O perfil de ácidos graxos no óleo de chia foi de 7,6% de ácido palmítico (C16:0), 2,7% de ácido esteárico (C18:0), 7,5% de ácido oleico (C18:1), 19,9% de ácido linoleico (C18:2), 62,3% de ácido linolênico-alfa (ALA) (C18:3) (**Tabela 5 e Figura 4**).

Tabela 5. Caracterização química da semente de chia

Componentes	Conteúdo (g/100g)
Carboidratos	3,18
Proteínas	20,67
Lipídios	27,15
Gorduras saturadas	2,79
Gorduras monoinsaturadas	2,04
Gorduras poli-insaturadas	22,32
Fibra alimentar total	37,91
Fibra alimentar solúvel	3,43
Fibra alimentar insolúvel	34,48
Umidade	6,86
Cinzas	4,15
Fenóis (mg GAE/g)	1,39
DPPH (µmol trolox/g)	4,36

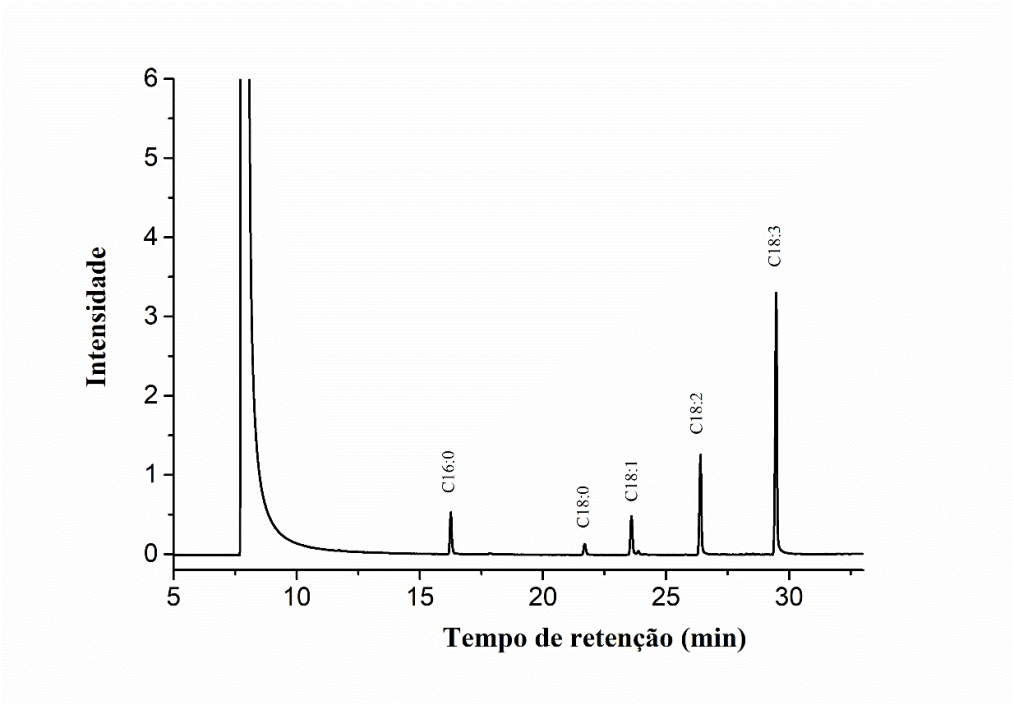

Figura 4. Cromatograma de óleo de chia com identificação dos ácidos graxos. Picos: P1: ácido palmítico (7,6% - C16: 0); P2: ácido esteárico (2,7% - C18: 0); P3: ácido oléico (7,5% - C18: 1); P4: ácido linoleico (19,9% - C18: 2); P5: ácido alfa-linolênico (62,3% - C18: 3). Destes, 10,3% são gorduras saturadas, 7,5% monoinsaturadas, e 82,2% de poli-insaturadas.

5.2. Efeitos dos tratamentos no consumo alimentar e medidas biométricas

O consumo alimentar em gramas ao final do experimento foi maior no grupo AIN-93M, quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$) (**Tabela 6**). Em contraste, o consumo alimentar energético (Kcal) foi menor no grupo controle AIN93-M ($p < 0,05$) (**Tabela 6**). O coeficiente de eficiência alimentar, assim como o coeficiente de eficiência energética não diferiram entre os grupos. O consumo alimentar diário em gramas de semente de chia foi 2,14 ± 0,14, e de seu óleo foi 0,58 ± 0,04. (**Tabela 6**). De acordo com o consumo alimentar dos animais dos grupos testes, o consumo médio diário de ômega 3 no grupo semente de chia (SC) foi 0,48g, e no grupo óleo de chia (OC) foi de 0,46g. Os animais iniciaram a fase de tratamento com o peso corporal homogêneo (**Tabela 6**). Após o período experimental, observou-se que o consumo alimentar da semente e do óleo de chia não interferiram no peso corporal final dos animais alimentados com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFHF) ($p > 0,05$) (**Tabela 6**). Também não foi observada diferença no perímetro abdominal, comprimento nasoanal e índice de Lee ($p > 0,05$)

Tabela 6. Consumo alimentar e medidas biométricas de ratos Wistar alimentados com dieta HFHF e tratados com semente ou óleo de chia durante 10 semanas.

Variáveis	AIN93-M	HFHF	SC	OC
Ingestão alimentar (g)	1398,33 ± 20,55 [a]	1015,57 ± 94,50 [b]	1052,12 ± 65,01 [b]	1011,07 ± 64,25 [b]
Ingestão alimentar (Kcal)	4852,93 ± 245,19 [b]	5499,83 ± 684,94 [a]	5534,17 ± 341,97 [a]	5267,66 ± 334,78 [a]
Consumo alimento teste (g)	NA	NA	2,14 ± 0,14	0,58 ± 0,04
Peso inicial (g)*	349,94 ± 30,71	357,95 ± 25,17	362,45 ± 37,39	364,17 ± 36,71
Peso final (g)	415,02 ± 34,52	421,46 ± 43,22	438,97 ±37,31	416,27 ± 47,46
Ganho de peso (g)	65,07 ± 22,70	63,51 ± 30,94	76,52 ± 26,92	52,10 ± 30,70
Perímetro da cintura (cm)	18,85 ± 0,78	19,42 ± 1,38	19,93 ± 1,06	19,17 ± 0,32
Comprimento nasoanal (cm)	25,50 ± 1,20	25,35 ± 0,78	26,15 ± 0,67	25,60 ± 0,77
Índice de Lee (g/cm³)	292,80 ± 14,55	299,10 ± 11,88	290,55 ± 9,61	291,36 ± 10,30

Medidas biométricas e consumo alimentar dos animais alimentados com dieta padrão (AIN-93M); e dieta rica em gordura saturada e frutose (grupo HFHF); dieta semente de chia (grupo SC): dieta HFHF com substituição de 4% de óleo de soja para lipídio proveniente da semente de chia; e dieta óleo de chia (grupo OC): dieta HFHF com substituição de 4% do óleo de soja para lipídio proveniente de óleo de chia. Todos os parâmetros foram mensurados ao final do experimento (10 semanas). *Peso inicial: mensurado no início do experimento. Os valores são representados pelas médias e desvio padrão (n=10). As médias foram analisadas pelo teste ANOVA *"one way"* seguido do teste *post hoc* Newman-Keuls a 5% de probabilidade, exceto para a ingestão alimentar (C), dado não paramétrico, usou-se o Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* Dunn's. Letras diferentes indicam médias com diferenças significativas ($p < 0,05$). Médias sem letra significa que não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p > 0,05$)

5.3. Efeitos dos tratamentos na adiposidade

Em relação aos tecidos adiposos dos animais, o grupo HFHF apresentou aumento nos tecidos adiposos (TA) epididimal, visceral, gordura total e adiposidade corporal, quando comparado ao grupo AIN-93M (**Figura 5A, 5C, 5D e 5E**). O grupo teste OC foi capaz de reduzir esses tecidos, quando comparado ao grupo HFHF, e equiparou-se ao grupo controle normal (AIN-93M) ($p < 0,05$), com exceção do epididimal. Não foi observado o mesmo efeito pelo consumo da semente de chia (**Figura 5A, 5C, 5D e 5E**). Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais em relação ao tecido adiposo retroperitoneal (**Figura 5B**).

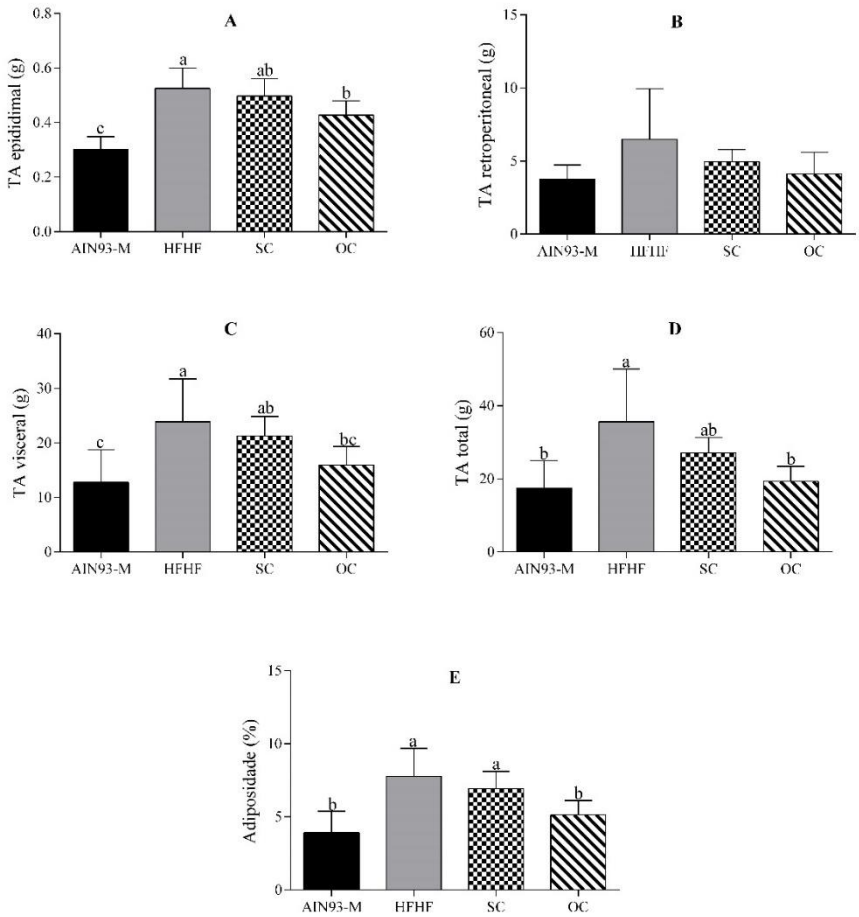

Figura 5. Adiposidade dos animais. Tecidos adiposos (TA) edipidimal (A), retroperitoneal (B), gordura visceral (C), tecido adiposo total (D), adiposidade corporal (E) dos animais ao final do tratamento (10 semanas). Animais alimentados com dieta padrão (AIN-93M); dieta rica em gordura saturada e frutose (grupo HFHF); dieta teste semente de chia (grupo SC): dieta HFHF com substituição de 4% de óleo de soja para lipídio proveniente da semente de chia; e dieta teste óleo de chia (grupo OC): dieta HFHF com substituição de 4% do óleo de soja para lipídio proveniente de óleo de chia. Os valores são representados pelas médias e desvio padrão (n=10). As médias foram analisadas pelo teste ANOVA *"one way"* seguido do teste *post hoc* Newman-Keuls a 5% de probabilidade. Letras diferentes indicam médias com diferenças significativas ($p < 0,05$). Médias sem letras significa que não houve diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$).

5.4. Efeitos dos tratamentos nas variáveis bioquímicas

Observou-se aumento de glicose e triglicerídeos no grupo HFHF em relação ao grupo AIN-93M ($p < 0,05$). O óleo de chia se mostrou eficaz em reduzir a glicemia e o triglicerídeo (**Tabela 7**), enquanto que a semente de chia não diferiu entre os grupos experimentais ($p > 0,05$).

Quanto as enzimas hepáticas, a aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), aumentaram no grupo HFHF quando comparada ao grupo AIN-93M ($p < 0,05$). Os grupos testes SC e OC não se mostraram eficazes na redução dessas enzimas hepáticas ($p > 0,05$). Em relação ao ácido úrico, o grupo HFHF apresentou aumento significativo em relação ao grupo AIN93-M ($p < 0,05$). Apesar de ambos os tratamentos, SC e OC, não terem diferido do grupo HFHF, estes se equipararam ao grupo controle AIN-93M (**Tabela 7**).

Tabela 7. Variáveis bioquímicas de ratos Wistar induzidos a alterações metabólicas com dieta HFHF e tratados com semente ou óleo de chia durante 10 semanas.

Variáveis	AIN93-M	HFHF	SC	OC
Glicose (mg/dL)	82,14 ± 12,14 [b]	100,86 ± 7,82 [a]	89,17 ± 11,89 [ab]	82,71 ± 11,53 [b]
TG (mg/dL)	122,6 ± 18,66 [b]	147,8 ± 21,57 [a]	130,4 ± 7,83 [ab]	115,8 ± 7,36 [b]
AST (U/L)	98,57 ± 23,70 [b]	150,71 ± 30,35 [a]	172,0 ± 40,02 [a]	172,86 ± 12,13 [a]
ALT (U/L)	29,0 ± 11,07 [b]	51,33 ± 16,89 [a]	39,67 ± 6,26 [ab]	52,11 ± 17,74 [a]
Ácido úrico (mg/dL)	1,33 ± 0,67 [b]	3,38 ± 2,38 [a]	2,43 ± 1,25 [ab]	1,73 ± 1,24 [ab]

Variáveis bioquímicas dos animais alimentados com dieta padrão (AIN-93M); dieta rica em gordura saturada e frutose (grupo HFHF); dieta teste semente de chia (grupo SC): dieta HFHF com substituição de 4% de óleo de soja para lipídio proveniente da semente de chia; e dieta teste óleo de chia (grupo OC): dieta HFHF com substituição de 4% do óleo de soja para lipídio proveniente de óleo de chia. Os valores são representados pelas médias e desvio padrão (n=10). As médias foram analisadas pelo teste ANOVA *"one way"* seguido do teste *post hoc* Newman-Keuls a 5% de probabilidade. Letras diferentes indicam médias com diferenças significativas ($p < 0,05$). Médias sem letras significa que não houve diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$). AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; TG: triglicerídeo.

5.5. Efeito na capacidade antioxidante total, enzimas antioxidantes e biomarcadores do estresse oxidativo

A TAC no fígado dos animais dos grupos HFHF foi menor comparado aos animais do grupo AIN-93M ($p < 0,05$). Embora os grupos testes SC e OC não foram capazes de restaurar a TAC no fígado ($p > 0,05$) (**Figura 6A**), a mesma no grupo OC equiparou-se ao AIN-93M. Entretanto, a TAC do plasma, não diferiu entre os grupos experimentais ($p > 0,05$) (**Figura 6B**). Em relação a enzima antioxidante SOD, o grupo HFHF não diferiu do grupo AIN-93-M ($p > 0,05$). Contudo, o consumo da semente e do óleo de chia proporcionou aumento dos níveis da atividade da SOD ($p > 0,05$) (**Figura 6C**), enquanto a enzima CAT (**Figura 6D**) não diferiu entre os grupos experimentais (**Figura 6E**).

Na avaliação de produtos provenientes da peroxidação de lipídios, a concentração de MDA não diferiu entre os grupos experimentais ($p > 0,05$) (**Figura 6E**). No entanto, a concentração de NO, aumentou no grupo HFHF comparado ao AIN93M ($p < 0,05$), sendo o óleo de chia capaz de reduzir o NO ($p < 0,05$). O grupo semente de chia não diferiu do grupo HFHF, porém também se equiparou aos grupos controle e OC ($p > 0,05$) (**Figura 6F**).

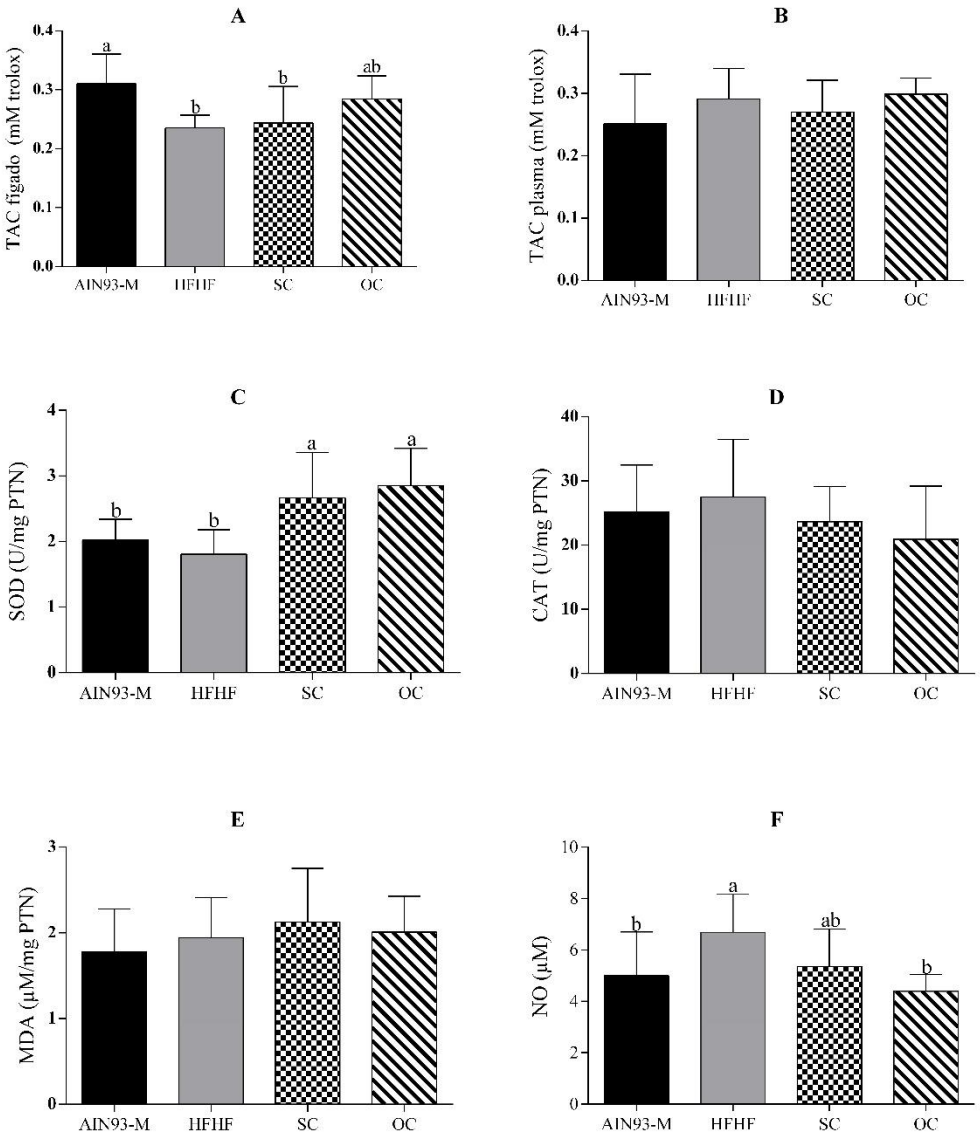

Figura 6. Avaliação da capacidade antioxidante total, enzimas antioxidantes e biomarcadores do estresse oxidativo nos amimais. Capacidade antioxidante total (TAC) no fígado (A) e no plasma (B), enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) (C), e catalase (CAT) (D) no fígado, e biomarcador do estresse oxidativo malondialdeído (MDA) (E), e óxido nítrico (NO) (F), avaliados no fígado dos animais alimentados com dieta padrão (AIN-93M); dieta rica em gordura saturada e frutose (grupo HFHF); dieta teste semente de chia (grupo SC): dieta HFHF adicionada de 4% de lipídio proveniente da semente de chia; dieta teste óleo de chia (grupo OC): dieta HFHF adicionada de 4% de lipídio proveniente do óleo de chia. Os valores são representados pelas médias, com seu desvio padrão representado pela barra (n=10). As médias foram analisadas pelo teste ANOVA *"one way"* seguido do teste *post hoc* Newman-Keuls a 5% de probabilidade. Letras diferentes indicam médias com diferenças significativas ($p < 0,05$). Médias sem letras significa que não houve diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$).

5.6. Efeitos na inflamação

A inflamação foi avaliada por meio da quantificação de citocinas pró e anti-inflamatória no fígado, do leucograma (**Figura 7**) e infiltrado inflamatório (**Tabela 8**) no fígado dos animais. O consumo da dieta HFHF demonstrou induzir alterações pró-inflamatórias por meio do aumento dos níveis de TNF no fígado dos animais do grupo HFHF, quando comparado ao grupo controle AIN93-M ($p < 0,05$). Os grupos testes SC e OC não foram capazes de reduzir os níveis dessa citocina pró-inflamatória ($p < 0,05$) (**Figura 7A**). Quanto aos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, não foi observado diferença entre os grupos experimentais ($p > 0,05$) (**Figura 7B)**.

Em relação ao leucograma dos animais, não houve diferença entre os grupos em relação as variáveis avaliadas tais como leucócitos, linfócitos, plaquetas; e razão linfócito/plaqueta (RPL) (**Figura 7C**) ($p > 0,05$). Quanto aos neutrófilos, observou-se aumento no grupo HFHF quando comparado ao grupo AIN93-M ($p < 0,05$), e os grupos tratamento SC e OC não apresentaram redução dos mesmos, uma vez que não diferiram do grupo HFHF ($p > 0,05$). No que se refere a razão neutrófilo/linfócito (RNL), houve aumento no grupo HFHF quando comparado ao grupo AIN-93M ($p < 0,05$), sendo que o consumo do óleo de chia (grupo OC) foi capaz de reduzir esta razão ($p < 0,05$), equiparando ao grupo AIN-93M ($p > 0,05$). A semente de chia não apresentou o mesmo efeito, como observado pelo óleo ($p > 0,05$) (**Figura 7D**).

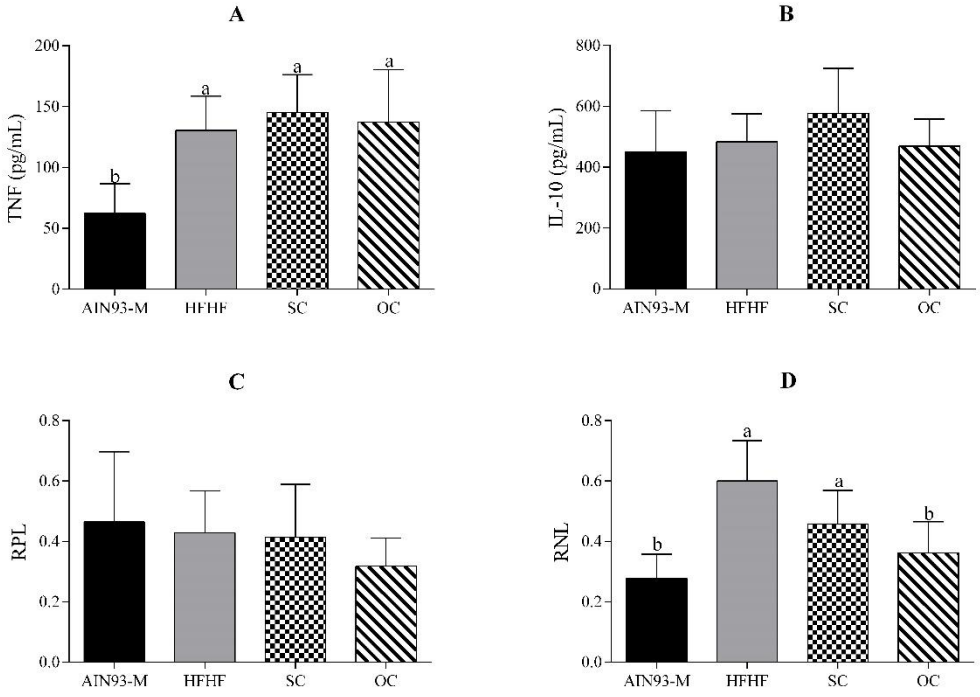

Figura 7. Avaliação da inflamação nos animais. Quantificação de citocinas: fator de necrose tumoral (TNF) (A), interleucina 10 (IL-10) (B) no fígado dos animais; e razão plaqueta linfócito (PLR) (C), razão neutrófilo linfócito (NLR) (D) em ratos alimentados com dieta padrão (AIN-93M); dieta rica em gordura saturada e frutose (grupo HFHF); dieta semente de chia (SC): dieta HFHF com substituição de 4% de óleo de soja para lipídio proveniente da semente de chia; e dieta óleo de chia (grupo OC): dieta HFHF com substituição de 4% do óleo de soja para lipídio proveniente de óleo de chia. Os valores são representados pelas médias e desvio padrão (n=10). As médias foram analisadas pelo teste ANOVA *"one way"* seguido do teste *post hoc* Newman-Keuls a 5% de probabilidade. Letras diferentes indicam médias com diferenças significativas (p< 0,05). Médias sem letras significa que não houve diferenças significativas entre os grupos (p> 0,05).

5.7. Efeitos nas medidas histomorfométricas no fígado

Em relação ao fígado dos animais, não houve diferença no peso do órgão e seu índice somático (p> 0,05) entre os grupos experimentais (**Figura 8A e 8B)**. Também não houve diferença entre os grupos em relação ao percentual do núcleo e do citoplasma de hepatócitos, vasos sanguíneos e infiltrados inflamatórios (p> 0,05*)*. Observou-se aumento no número de outras células no grupo AIN93-M em relação aos demais *(*p< 0,05) (**Tabela 8**). O percentual de hepatócitos mononucleados e binucleados não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais. Não houve diferença entre os grupos em relação aos infiltrados inflamatórios no fígado dos animais (p> 0,05*)* (**Tabela 8**).

O percentual de vesículas lipídicas no fígado dos animais do grupo AIN93-M apresentou-se com 15,7%, sendo classificado como esteatose hepática grau 1. O consumo da dieta HFHF aumentou o percentual para 26,7%, o que se classifica em

um quadro de esteatose hepática grau 2. Em relação aos grupos tratamentos, verificou-se que o consumo da semente e do óleo de chia mostraram-se eficientes na reversão do quadro da esteatose hepática para grau 1, com percentual de 16,7% (grupo SC) e 14,5% (grupo OC), respectivamente (**Figura 8C e 9C**). Em relação aos tipos de colágeno I, III e total, os mesmos não apresentaram diferenças entre os grupos (**Tabela 8**), o que demonstra que a dieta não induziu fibrose hepática nos animais.

Tabela 8. Histomorfometria do fígado de ratos Wistar induzidos a alterações metabólicas com dieta HFHF e tratados com semente ou óleo de chia durante 10 semanas.

Parâmetro (%)	**AIN93-M**	**HFHF**	**SC**	**OC**
Núcleo de hepatócitos	9,84 ± 2,10	8,69 ± 1,62	8,31 ± 1,48	9,02 ± 1,95
Citoplasma de hepatócitos	56,58 ± 7,52	53,60 ± 6,15	58,99 ± 4,25	63,31 ± 8,44
Vasos sanguíneos	7,16 ± 2,84	6,36 ± 3,48	10,62 ± 4,19	9,56 ± 4,25
Núcleo de outras células	10,83 ± 3,49 [a]	4,68 ± 1,00 [b]	5,43 ± 3,27 [b]	3,64 ± 1,16 [b]
Infiltrados inflamatórios	1,18 ± 0,70	0,95 ± 0,46	0,99 ± 0,66	0,91 ± 0,26
Hepatócito mononucleado	94,05 ± 1,02	94,43 ± 0,85	95,03 ± 0,62	94,45 ± 0,69
Hepatócito binucleado	5,95 ± 1,02	5,56 ± 0,85	4,97 ± 0,62	5,54 ± 0,69
Colágeno tipo I	0,62 ± 0,20	0,57 ± 0,24	0,52 ± 0,16	0,58 ± 0,11
Colágeno tipo III	0,40 ± 0,15	0,32 ± 0,06	0,41 ± 0,26	0,40 ± 0,07
Colágeno total	1,03 ± 0,19	0,89 ± 0,28	0,93 ± 0,40	0,98 ± 0,13

Histomorfometria no fígado de animais alimentados com dieta padrão (AIN-93M); e dieta rica em gordura saturada e frutose (grupo HFHF); dieta semente de chia (SC): dieta HFHF com substituição de 4% de óleo de soja para lipídio proveniente da semente de chia; e dieta óleo de chia (grupo OC): dieta HFHF com substituição de 4% do óleo de soja para lipídio proveniente de óleo de chia. Os valores são representados pelas médias e desvio padrão (n=10). As médias foram analisadas pelo teste ANOVA *"one way"* seguido do teste *post hoc* Newman-Keuls a 5% de probabilidade. Letras diferentes indicam médias com diferenças significativas ($p < 0,05$). Médias sem letras significam que não houve diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$).

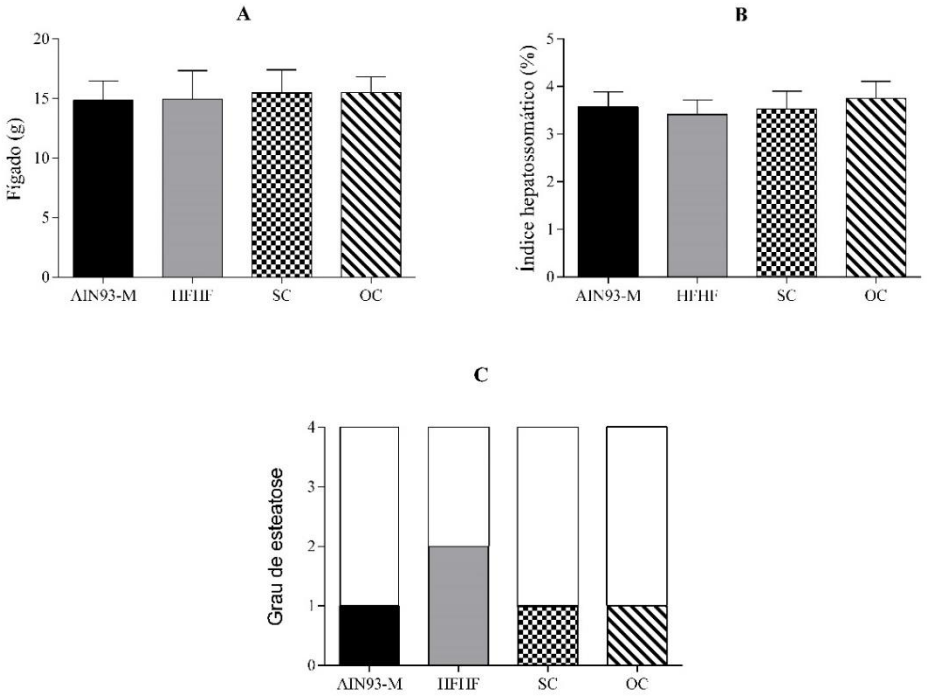

Figura 8. Peso do fígado (A); Índice hepatossomático (B) e grau de esteatose (C) dos animais. A classificação do grau de esteatose hepática varia do grau 0 a grau 4, de acordo com a classificação de Turlin et al. (2001). Os animais dos grupos alimentados com dieta padrão (AIN-93M) tiveram 15,7% de lipídios no fígado, sendo classificado como Grau 1; grupo que recebeu dieta rica em gordura saturada e frutose (grupo HFHF) classificado com 26,7% de lipídios (Grau 2); grupo semente de chia (SC), que recebeu dieta HFHF com substituição de 4% de óleo de soja para lipídio proveniente da semente de chia (equivalente a 14,7% de semente de chia) reduziu o grau de estetose para Grau 1, com 16,7% de lipídios; assim como o grupo óleo de chia, que recebeu dieta HFHF com substituição de 4% do óleo de soja para lipídio proveniente de óleo de chia com 14,5 % de lipídios (Grau 1).

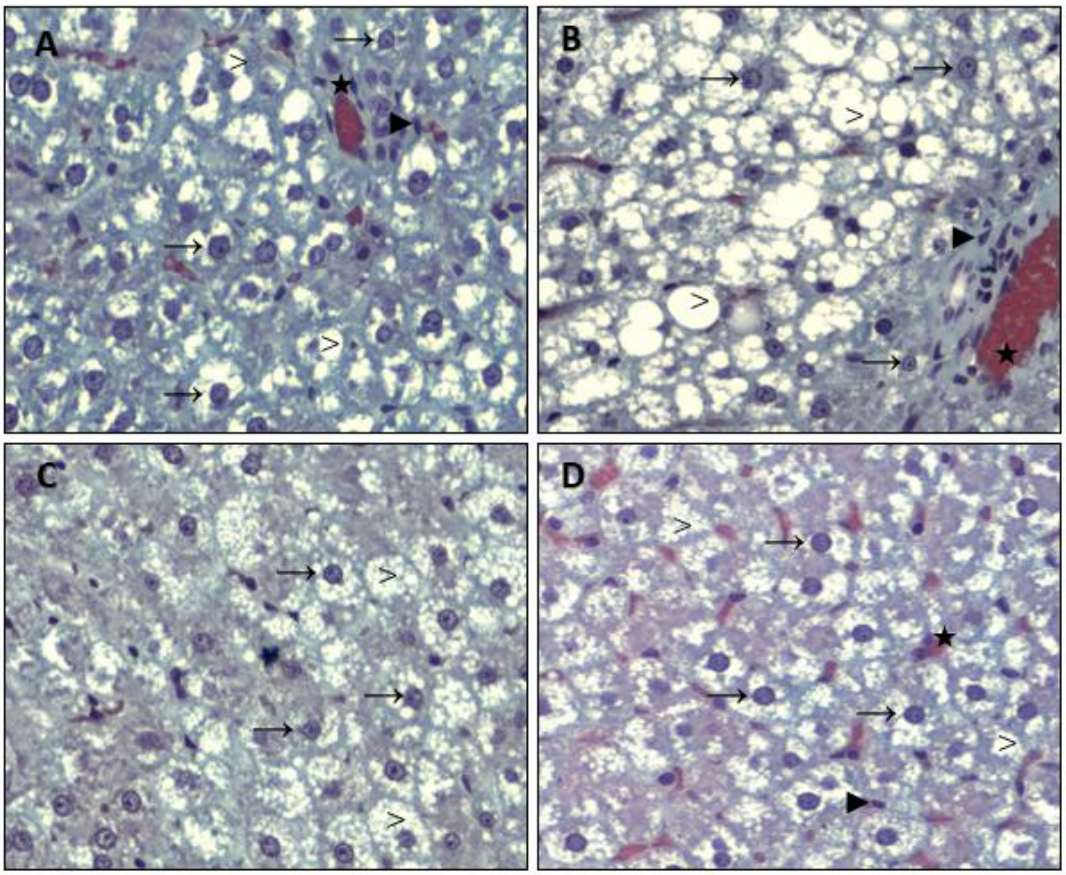

Figura 9. Fotomicrografias representativas de cortes de fígado dos animais (n=6). Os ratos foram alimentados com dieta padrão (AIN-93M) (A); dieta rica em gordura saturada e frutose (grupo HFHF) (B); dieta semente de chia (SC): dieta HFHF com substituição de 4% de óleo de soja para lipídio proveniente da semente de chia (C); e dieta óleo de chia (grupo OC): dieta HFHF com substituição de 4% do óleo de soja para lipídio proveniente de óleo de chia (D). Coloração: Tricrômio de Gomori - (→) Núcleo de hepatócito; (►) outras células; (>) Gotículas lipídicas; (★) Vasos sanguíneos. Barra = 50µm.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou os potenciais benefícios do consumo da semente e do óleo de chia na modulação de alterações metabólicas em ratos Wistar machos alimentados com dieta rica em gordura saturada e frutose (dieta HFHF). A composição química da semente de chia se equiparou com a chia utilizada em outros estudos (Da SILVA et al., 2017; GRANCIERI, MARTINO; de MEJIA, 2019). O óleo de chia utilizado no experimento atendeu aos requisitos de qualidade estabelecidos pela legislação brasileira para óleos prensados a frio e não refinados, avaliados pelo índice de peróxido (IP) e acidez, que delega máximo 15 meq/kg para IP e acidez máxima de 4,0 mg KOH/g (BRASIL, 2005).

Sabe-se que a produção excessiva de energia, principalmente proveniente do consumo de dietas ricas em gordura saturada e frutose, leva ao aumento do

influxo de AGL. Em primeiro momento, há aumento da combustão energética, gerando sobrecarga da beta-oxidação mitocondrial. Posteriormente, há redução da mesma, assim como a elevada síntese de triglicerídeos, aumentando o depósito de gordura no tecido adiposo e fígado (WOO et al., 2019; JEGATHEESAN, P.; De BANDT, 2017; BAWDEN et al., 2016). Essa saturação da via oxidativa e a retenção de lipídios no tecido hepático, aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERN), tais como superóxido, radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio, NO, peroxinitrito. Esses radicais livres podem esgotar os antioxidantes endógenos, e inibir a atividade de enzimas antioxidantes, induzindo o estresse oxidativo (ORE; AKINLOYE, 2019; BERNARDES et al., 2017). Além disso, essas alterações metabólicas decorrem em aumento de enzimas hepáticas, e induzem um estado pró-inflamatório tecidual e sistêmico (JEGATHEESAN; De BANDT, 2017). O modelo de dieta experimental HFHF utilizado em nosso estudo, mostrou-se eficiente em induzir alterações metabólicas nos animais. Tais alterações se destacam pelo aumento da adiposidade tecidual e corporal, dos níveis de TNF no fígado e aumento na razão neutrófilo/linfócito (RNL), demonstrando ativar a inflamação. Essa dieta promoveu redução da TAC e aumentou os níveis hepáticos de NO. O aumento da glicemia e dos níveis de triglicerídeos também foram constatados, assim como o aumento do percentual de lipídios no fígado. Além disso, a dieta HFHF aumentou os níveis plasmáticos de AST, ALT e ácido úrico, que são marcadores bioquímicos envolvidos em lesão hepática (OZER et al., 2008). Outros estudos da literatura com desenho experimental semelhante, ofertaram dieta HFHF à ratos Wistar adultos machos, com 17,5% e 20% de frutose; e 20% e 31% de gordura saturada, respectivamente (POUDYAL et al., 2012a, 2012b; MARINELI et al., 2015a, 2015b). Os autores verificaram alterações semelhantes às causadas em nosso estudo, como aumento da adiposidade visceral, glicemia, AST, ALT, esteatose hepática e indução do estresse oxidativo (POUDYAL et al., 2012a; POUDYAL et al., 2012b; MARINELI et al., 2015a; MARINELI et al., 2015b).

No presente estudo, a substituição total do lipídio proveniente do óleo de soja da dieta HFHF pelo óleo ou semente de chia nas dietas testes OC e SC, forneceu respectivamente, 4% da fonte lipídica advindos do óleo de chia (grupo OC), ou da semente de chia, a qual ofertou a quantidade de 14,7% de semente

(grupo SC). O excelente perfil de ácidos graxos encontrados na chia estudada, sendo o majoritário o ácido α-linolênico (ALA - 62,3%), vai de encontro aos resultados de outros estudos, aos quais a quantidade de ALA varia de 54 a 67% (Da SILVA et al., 2016; RINCÓN-CERVERA et al., 2016; ULLAH et al., 2015). Essa substituição do conteúdo lipídico nos permitiu reduzir a razão ω-6:ω-3 nas dietas tratamentos (1,46:1), quando comparada à dieta HFHF (5,77:1). Em nosso estudo, o consumo alimentar dos animais ao final do experimento, foi menor nos animais que receberam as dietas HFHF, SC e OC comparado ao grupo controle normal (AIN-93M). Isso se deve ao fato de que dietas hiperlipídicas, como a do nosso estudo (61%), possuem elevada densidade energética e os lipídios podem conferir maior saciedade (KOZIMOR; CHANG; COOPER, 2013). Marineli et al. (2015a), com desenho experimental semelhante, encontrou o mesmo efeito na ingestão alimentar. Em nosso estudo, a redução da TAC verificada no fígado dos animais do grupo HFHF, pode ser atribuída a gordura saturada e frutose, as quais causaram aumento de radicais livres, observado pelos níveis de NO hepático. Além disso, a dieta HFHF apresentou redução de compostos antioxidantes, o que ocasionou o desequilíbrio no sistema redox, com consequente diminuição da defesa antioxidante endógena. Apesar da TAC no fígado dos animais alimentados com semente (grupo SC) e óleo de chia (grupo OC) não diferirem do grupo HFHF, o grupo OC se equiparou ao grupo controle AIN93-M, demonstrando haver uma tendência no aumento da mesma.

Nós acreditamos que a restauração do sistema antioxidante observada pelo aumento da atividade da enzima SOD em ambos os grupos testes SC e OC, se deve aos diferentes tipos de compostos antioxidantes presentes em ambas matrizes alimentares, semente e óleo, tais como ALA, fenólicos hidrofílicos e lipofílicos, isoflavonas, vitaminas e minerais, visto que estes possuem ação antioxidante (OLIVEIRA-ALVES et al., 2017; Da SILVA et al., 2017; MARINELI et al., 2014). Além disso, esse aumento da SOD pode ser em função da redução da TAC e do aumento do radical livre NO no fígado dos animais do grupo HFHF, permitindo o aumento da mesma, a fim de restaurar o sistema antioxidante. A SOD, juntamente com outras enzimas, faz parte da linha de defesa primária do sistema antioxidante, e mantém o ambiente redutor das células, regulando o sistema redox (KHOSRAVI et al., 2019). Esta enzima é responsável por remover o ânion superóxido, e o

converter em oxigênio e H_2O_2, que em seguida, é degradada pela GPx e CAT (SHIN et al., 2018, JONES, et al., 1981). Em nosso estudo não foi possível observar aumento nos níveis de CAT nos grupos testes SC e OC, como visto na atividade da SOD. Isso pode ser devido as enzimas do sistema redox responderem de formas diferentes aos radicais livres (KHOSRAVI et al., 2019). Uma das vias do estresse oxidativo é por meio do aumento do NO, que juntamente com radical livre superóxido, levam a formação do composto peroxinitrito, que pode gerar danos celulares, no DNA, RNA, lipídios, tióis, aminoácidos e antioxidantes (SQUADRITO; PRYOR, 1998; O'DONNELL et al., 1999). A redução do NO pelo consumo do óleo de chia, demonstrou reduzir o estresse oxidativo. Apesar do grupo semente de chia (SC) não ter diferido do grupo HFHF, seus níveis de NO se equipararam aos do grupo controle normal (AIN-93M). Esse efeito se deve provavelmente, aos componentes com potencial antioxidante da chia, que podem diminuir a produção de radicais livres e a peroxidação lipídica. Tais efeitos observados também, em estudos com ratos Wistar que ofertaram semente de chia (36.2%) (FERREIRA et al. 2016); e semente (13,3%) e óleo de chia (4%) (MARINELI et al., 2015a). Toscano et al. (2014) verificaram que a concentração sérica de nitrito, um metabólito do NO, reduziu após ofertar 35 g/dia de farinha de chia durante 12 semanas à pacientes hipertensos. Em relação ao MDA hepático, marcador de peroxidação lipídica, não foi possível observar diferença entres os grupos experimentais do nosso estudo. Esse mesmo efeito do MDA foi observado por Da Silva et al. (2018), que utilizaram dieta controle, HFD e HFD+farinha de chia (41,68%). Contudo, esses autores também observaram melhora antioxidante, por meio do aumento da SOD e CAT no fígado (Da SILVA et al., 2018). Marineli et al. (2015a) e Da Silva et al. (2019) avaliaram os níveis de TBARS em ratos Wistar, e verificaram que a dieta HFHF e HFD, respectivamente, foram capazes de aumentar os níveis de TBARS em relação aos animais alimentados com dieta controle normal (AIN-93M), sendo que Marineli et al. (2015a) não observaram efeito da semente e do óleo de chia na redução do TBARS no fígado, embora ambos (semente e óleo) tenham atuado na redução do mesmo no plasma (MARINELI et al., 2015a). Já Da Silva et al. (2019), verificaram que a farinha de chia (23,26%) não foi eficiente em reduzir os níveis de TBARS.

A restauração do equilíbrio antioxidante promovida pelos componentes presentes na semente e no óleo, pode ter refletido na reversão da esteatose hepática para grau 1 nesses animais, ao comparar com os ratos do grupo HFHF, que apresentaram esteatose hepática grau 2, com 26,7% de vesículas lipídicas no fígado. Possivelmente, a redução de radicais livres e aumento da defesa antioxidante promovida pela chia, provavelmente decorreu em aumento da beta-oxidação no fígado desses animais (SPAHIS et al., 2017), ocasionando a redução do acúmulo de lipídios no fígado. Estudos realizados em humanos, verificaram que o consumo da semente de chia aumentou EPA no plasma (JIN et al., 2012; NIEMAN et al., 2012; VUKSAN et al., 2007). Já estudos com animais, demonstraram que o óleo de chia atua de forma eficiente na bioconversão do ALA em EPA e DHA no plasma, fígado, e tecido adiposo epididimal de ratos. Além disso, verificaram que o ω-3 regula positivamente fatores de transcrição responsáveis pelo aumento da beta-oxidação, biogênese mitocondrial, e redução da expressão de genes envolvidos na lipogênese (RINCÓN-CERVERA et al., 2016; GONZÁLEZ-MAÑÁN et al., 2012). Rincón-Cervera et al. (2017) ofertaram a ratos Wistar durante 21 dias, a quantidade de 10% de óleo de chia (63% ALA), tendo como grupo controle 10% de óleo de girassol (<1% ALA). O consumo do óleo de chia potencializou o sistema antioxidante por meio do aumento de enzimas antioxidantes, como SOD, CAT, GPx, GR, e constataram que, o aumento de ALA reduziu a expressão do SREBP1c, fator de transcrição envolvido na lipogênese (RICOULT; MANNING, 2013); e aumentou a expressão do PPAR-α e CPT-1, importantes reguladores da oxidação de ácidos graxos (SOFTIC et al., 2016; MCGARRY; FOSTER, 1980). Outros estudos experimentais que utilizaram dieta HFD ou HFHF, também confirmaram o efeito da chia no aumento de enzimas antioxidantes, além de aumentar expressão do PPAR-α (Da SILVA et al., 2018; Da SILVA et al., 2019) e PGC-1α (MARINELI et al., 2015b), envolvidos na beta-oxidação e biogênese mitocondrial (SPAHIS et al., 2017). Fernandez-Martínez et al. (2019) avaliaram que o consumo de semente de chia (15%) durante 4 semanas em ratos Wistar machos, induzidos à dislipidemia e NASH por meio dos fármacos, tiloxapol e tetracloreto de carbono, respectivamente. Os autores verificaram que a chia foi capaz de reduzir triglicerídeos, colesterol, e ALT, assim como aumentar CAT, e diminuir os níveis de TNF no plasma e no fígado, demonstrando que o consumo desse alimento foi

eficiente em reduzir os danos causados na NASH. Esses efeitos nos sugerem que um dos mecanismos para a redução da esteatose hepática, possa ter sido modulado pela regulação do sistema redox, com melhora antioxidante por meio dos compostos, e o próprio sinergismo entre os nutrientes da chia, e que principalmente o ALA, pode atuar em vias e fatores de transcrição envolvidos na redução da esteatose hepática.

Em relação aos animais do grupo HFHF, provavelmente não houve maior acúmulo de lipídios no fígado dos mesmos, devido a esta dieta ter uma distribuição de carboidratos de 31%, que pode não ter ativado de forma tão eficiente a lipogênese *de novo* (LDN), embora a causa da retenção de lipídios tenha sido o alto consumo de frutose e da gordura saturada contida nesta dieta. O consumo da dieta AIN-93M (grupo controle normal), induziu esteatose hepática grau 1 nos animais, que pode ter sido provavelmente, devido a dieta AIN-93M conter alta distribuição de carboidratos (76%), que possivelmente, ativou a via da LDN (ALEMANY, 2013). Portanto, provavelmente por isso, não se observou diferença na maioria dos marcadores histológicos entre os grupos experimentais. Embora a dieta HFHF tenha causado esteatose hepática, inflamação e estresse oxidativo no fígado dos animais, a mesma não foi capaz de induzir fibrose hepática, uma vez que não houve diferença em relação aos tipos de colágeno, I, III e total, entre os grupos experimentais.

A redução da adiposidade provocada pelo consumo do óleo de chia, não foi em função da densidade calórica e do consumo alimentar, uma vez que não houve diferença entre os grupos HFHF e OC. O consumo da semente de chia (grupo SC) não provocou o mesmo efeito sobre a adiposidade quando comparado ao grupo HFHF, embora tenha se equiparado ao grupo controle normal AIN-93M, sugerindo que possivelmente, com maior quantidade de semente de chia, e ou, maior tempo de tratamento em nosso trabalho, possivelmente, a semente poderia ter atuado na redução da adiposidade. O estresse oxidativo está intimamente associado à adiposidade e regulação da homeostase energética (WOO et al., 2019). Podemos dizer que a redução do estresse oxidativo e o reestabelecimento do equilíbrio do sistema redox pelo óleo, refletiu na melhora da adiposidade dos animais. Estudos realizados com ratos Wistar, notaram que a chia reduziu tecidos adiposos ou adiposidade corporal (FERREIRA et al., 2016; CREUS et al., 2016; OLIVA et al., 2013). Embora o nosso estudo apresentou redução da adiposidade corporal nos

animais, não se observou diferença no peso corporal entre os grupos experimentais, assim como no Índice de Lee, marcador de massa corporal utilizado para roedores (BERNARDIS; PATTERSON, 1968). Da mesma forma, Creus et al. (2016), observaram que a chia reduziu adiposidade visceral em ratos Wistar alimentados com dieta rica em sacarose, sem alterar o peso corporal. Esse fato nos confirma a importância da perda de gordura corporal, comparado à apenas a perda de peso corporal, uma vez que o tecido adiposo é um órgão altamente ativo, que pode induzir alterações metabólicas pró-inflamatórias e pró-oxidantes (HAFIDI et al., 2019). Isso também comprova que indivíduos classificados com IMC em eutrofia, podem apresentar alterações metabólicas, como aumento da adiposidade visceral, deposição de gordura no fígado, dislipidemia e inflamação, que são características metabólicas relacionadas com a obesidade, sendo estes, conhecidos como metabolicamente obesos, mas com peso normal. (WANG et al., 2015; LOPEZ-MIRANDA; PEREZ-MARTINEZ, 2013). Estudos da literatura demonstraram conteúdo aumentado de ALA e EPA em adipócitos de ratos (GONZÁLEZ-MAÑÁN et al., 2012; RINCÓN-CERVERA et al., 2016). Sabe-se que o aumento de ácidos graxos polliinsaturados ômega-3 na membrana fosfolipídica de adipócitos, podem aumentar a sensibilidade à insulina e captação de glicose (STORLIEN et al, 1991). Além disso, um estudo realizado com camundongos C57BL/6 obesos, alimentados com dieta HFD adicionada de 0,15% de óleo de chia também verificou redução da massa gorda, além do aumento da massa magra nos animais e redução da resistência à insulina (RI) (FONTE-FARIA et al., 2019). A redução da RI também foi observada por Marineli et al. (2015b). Esses mecanismos contribuem para redução de gordura observados pelos efeitos da chia, sendo que, a redução da adiposidade corporal por si só, pode contribuir na melhora do controle glicêmico (VUKSAN et al., 2017), e reduzir os níveis de triglicerídeos (FONTE-FARIA et al., 2019; FERREIRA et al., 2016, CREUS et al., 2016; OLIVA et al., 2013; POUDYAL et al., 2013), desfechos estes, confirmados em nosso estudo pelo consumo do óleo de chia.

Dietas hiperlipídicas, e principalmente a presença de gordura saturada, contribuem para um estado pró-inflamatório, por meio do aumento do tecido adiposo, estresse oxidativo e lipotoxicidade, sendo os lipídios responsáveis por ativar a sinalização da via TLR4/NF-κB, que culmina em aumento dos níveis de

TNF (KIM et al., 2019). Dietas ricas em frutoses também levam ao aumento da inflamação (CHEN et al., 2017), principalmente no fígado, exacerbando os níveis de TNF, como observado em nosso estudo. A semente e o óleo de chia não foram eficientes em reduzir esta citocina, assim como os níveis de ácido úrico, AST e ALT, e não ocasionou aumento nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10. Isso se deve provavelmente, pelo fato dessas dietas conterem 61% de lipídios, mesmo com alteração na composição lipídica, assim como a presença da frutose, que é um fator altamente pró-inflamatório, contribuindo para um dano hepático (CRESCENZO et al., 2018). Da Silva et al. (2019) observou o mesmo desfecho nos níveis de TNF, o qual aumentou nos animais alimentados com HFD, sendo que a farinha de chia não foi capaz de atuar na redução do TNF. Embora o óleo de chia tenha reduzido a RNL, marcador que se associa positivamente com a adiposidade, o mesmo parece ser o início da resolução da inflamação. Contudo, esta razão deve ser avaliada juntamente com outros marcadores inflamatórios à níveis sérico/tecidual, uma vez que, qualquer condição inflamatória pode afetar a medida da RNL (SUÁREZ-CUENCA et al, 2019). Portanto, a atuação do óleo de chia sob os mecanismos das alterações metabólicas, como redução da glicemia, triglicerídeos, estresse oxidativo, esteatose hepática, e da adiposidade corporal, parece ser independente da resolução da inflamação local, uma vez que o consumo da semente e do óleo não foi capaz de atuar na redução do marcador de inflamação TNF no fígado dos animais, ao comparar com o grupo HFHF. Mais estudos são necessários para continuar a investigação da atuação da chia nas vias inflamatórias.

Embora a matriz alimentar da semente de chia contenha proteína, fibras alimentares, micronutrientes, compostos bioativos, tais como os fenólicos e peptídeos bioativos (OLIVEIRA-ALVES et al., 2017; Da SILVA et al., 2016; GRANCIERI, MARTINO; de MEJIA, 2019), a mesma apresenta matriz alimentar mais compactada, e consequentemente, seus compostos podem estar menos biodisponíveis quando comparado ao óleo (**Figura 10**). Os efeitos proeminentes no óleo de chia nos sugerem que os benefícios do óleo podem ser devido à sua maior exposição às enzimas lipídicas digestivas, assim como pode ocorrer uma maior absorção e biodisponibilidade dos ácidos graxos, principalmente do ALA, e dos outros componentes lipofílicos, como tocoferol e fenólicos, e ou, o próprio

sinergismo da matriz alimentar, que possibilitam atuar em diferentes vias metabólicas, como visto em nosso estudo.

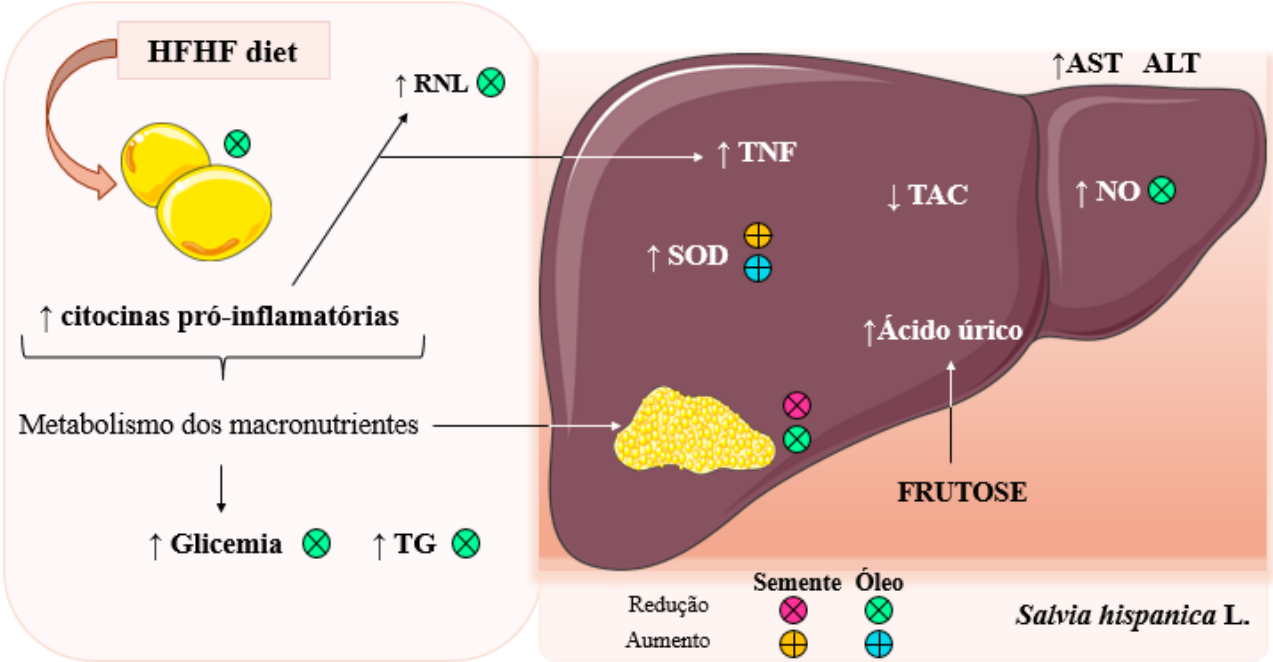

Figura 10. Alterações metabólicas causadas pelo consumo de dieta rica em gordura saturada e frutose (HFHF) e efeitos da semente e do óleo de chia encontrados em nosso estudo. Dietas HFHF decorrem em hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, os quais estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias e alteração de células do sistema imune, observado pelo aumento da RNL, e dos níveis de TNF no fígado dos animais. Esses mecanismos alteram o metabolismo dos carboidratos e lipídios, o que refletiu no aumento da glicemia e dos níveis de triglicerídeo, redução da TAC no fígado, esteatose hepática, peroxidação lipídica observada pelos níveis de NO, além de aumento dos marcadores de dano hepático, AST, ALT e ácidos úrico. A semente e o óleo de chia restauraram o sistema antioxidante, por meio do aumento da enzima SOD, reduziram o grau de esteatose hepática. Além disso, o óleo de chia reduziu a adiposidade, atuou na redução da peroxidação lipídica com redução dos níveis de NO, refletindo na redução dos níveis de glicose e de triglicerídeos nos animais. ↑: aumento; ↓: redução; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; HFHF: *high fat and high fructose diet*; NO: óxido nítrico; RNL: razão neutrófilo/linfócito; SOD: superóxido dismutase; TAC: capacidade antioxidante total; TG: triglicerídeo; TNF: fator de necrose tumoral.

7. CONCLUSÃO

A dieta rica em gordura saturada e frutose foi um modelo eficiente em induzir alterações metabólicas nos animais. O consumo da semente e do óleo de chia restaurou o sistema antioxidante e reduziu o grau de esteatose hepática. Além disso, o consumo do óleo de chia favoreceu a redução da adiposidade corporal, da glicemia, dos níveis de triglicerídeos, da peroxidação lipídica, e da RNL. A atuação da chia sob a inflamação causada pelo consumo de dietas desbalanceadas, requer maiores investigações. Em geral, a chia demonstrou atuar no controle metabólico de ratos Wistar adultos alimentados com dieta rica em gordura saturada e frutose. Portanto, a chia pode ser considerada um alimento com alto potencial funcional no controle metabólico de alterações causadas pelo consumo de dietas desequilibradas.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em geral, considerando a substituição de 4% do óleo de soja da dieta HFHF, pela mesma quantidade dos lipídios provenientes da semente e do óleo de chia nas dietas HFHF. Essa mudança nos permitiu aumentar o conteúdo de ω-3 e reduzir ω-6, o qual apresentou consumo médio diário de ALA de 0,46g, nos animais do grupo óleo de chia, e 0,48g nos animais alimentados pela semente. Sendo assim, ao extrapolar os resultados do nosso experimento para um possível consumo para humanos, refletiria em uma quantidade de ômega-3 diário de 65,61 g, advindos da semente de chia, 66,31 g de ômega-3, advindos do óleo de chia, ao considerar um indivíduo adulto de 60 Kg. Ao levar em consideração o alimento, isso significa 392 g de semente de chia, e 106,5 mL de óleo de chia. Contudo, este estudo objetivou avaliar o efeito da substituição da fonte lipídica óleo de soja, para lipídios provenientes da chia, semente e óleo, na reversão de alterações metabólicas causadas pelo consumo de dieta rica em gordura saturada e frutose em ratos Wistar. Portanto, quando a quantidade de chia é extrapolada para humanos à nível de ALA, principal ácido graxo encontrado na chia, reflete em grandes quantidades diárias de chia. Nesse estudo, nós procuramos simular um ambiente orgânico semelhante ao de indivíduos com alto consumo de alimentos ultraprocessados, como observado principalmente pelas dietas ocidentais. Sendo assim, mais estudos são necessários a fim de continuar a explorar as vias e mecanismos moleculares envolvidos nos processos de alterações metabólicas, principalmente na lipogênese, beta-oxidação, inflamação e na via do metabolismo da glicose. Além disso, se faz necessário estabelecer quantidades seguras e eficazes, sem risco de toxicidade, para possível extrapolação para consumo humano.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA-GÓMEZ, L. et al. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. **The Lancet**, v.390, n.10113, p.2627–2642, 2017.

ABDELMALEK, M. F. et al. Higher dietary fructose is associated with impaired hepatic adenosine triphosphate homeostasis in obese individuals with type 2 diabetes. **Hepatology**, v. 56, n.3, p. 952–960, 2012.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.

ALEMANY, M. Relationship between energy dense diets and white adipose tissue inflammation in metabolic syndrome. **Nutrition Research**, v.33, p.1-11, 2013.

ALI, N. M. et al. The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. **Journal of biomedicine & Biotechnology**; 171956, 2012.

ALLENTOFF, A. J. et al. Heterolytic versus homolytic peroxide bond cleave by sperm whale myoglobin and myoglobin mutants. **Journal of the American Chemical Society**, v.114, p.9744-9749, 1992.

ALLER, E., E., J., G. et al. Erik E. J. G. Starches, Sugars and Obesity. **Nutrients**, v.3, p.341–369, 2011.

AMERICAN OIL CHEMISTS´ SOCIETY. **Official methods and recommended praticces of the American Oil Chemists` Society**. 4th ed. Champaign, USA, AOCS, 1990.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International: Agricultural chemicals, contaminants, drugs**. v.16, n.1, p. Gaithersburg: AOAC International, 2012.

AYERZA, R ; COATES, W. Composition of chia (*Salvia hispanica*) grown in six tropical and sub-tropical ecosystems of South America. **Tropical Science**, v.44, p. 131–135, 2004.

AYERZA, R. Effects of seed color and growing locations on fatty acid content and composition of two chia (*Salvia hispanica L.*) genotypes. **Journal of the American Oil Chemists**, v.87, p.1161–1165, 2010.

AZIZ, A., A. et al. Increasing Dietary alpha-linolenic acid enhances tissue levels of long-chain n-3 PUFA when linoleic acid intake is low in hamsters. **Annals of nutrition & metabolism**, v.57, p.50-58, 2010.

BAFFY, G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: The emerging view. **Journal of Hepatology**, v.51, p.212-223, 2009.

BAKER, E. J. et al. Metabolism and Functional Effects of Plant-Derived Omega-3 Fatty Acids in Humans, **Progress in Lipid Research**, v.64, p. 30-56, 2016.

BARREIROS, R. C.; BOSSOLAN, G., TRINDADE, C. E. P. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. **Revista de Nutrição**, v.18, n.3, p.377-389,2005.

BAWDEN, S. J. et al. Investigating the effects of an oral fructose challenge on hepatic ATP reserves in healthy volunteers: A31P MRS study. **Clinical Nutrition**, v.35, n.3, p.645–649, 2016.

BELENGUER-VAREA, Á. et al. Oxidative stress and exceptional human longevity: Systematic review. **Free Radical Biology and Medicine**, v.21, S0891-5849(19)31092-5, 2019.

BERNARDES, N. et al. Excessive consumption of fructose causes cardiometabolic dysfunctions through oxidative stress and inflammation. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.95, n.10, p.1078-1090, 2017.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between "Lee index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v.40, n.4, p.527-528, 1968.

BLASBALG, T., L. et al. Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. **The American journal of clinical nutrition**, v.93, p.950-962, 2011.

BLOOR, S. J. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. **Methods in Enzymology**, v.335, p.3–14, 2001.

BOLAND, B. B. et al. Pancreatic β-Cell Rest Replenishes Insulin Secretory Capacity and Attenuates Diabetes in an Extreme Model of Obese Type 2 Diabetes. **Diabetes**, n.50, p.1–30, 2018.

BORGES, M. D. et al., Relationship between Proinflammatory Cytokines/Chemokines and Adipokines in Serum of Young Adults with Obesity. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v.18, n.3, 2018.

BORNEO, R.; AGUIRRE, A.; LEÓN, A. E. Chia (*Salvia hispanica L.*) Gel can be used as egg or oil replacer in cake formulations. **Journal of the American Dietetic Association**, v.110, n.6, p.946-949, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgramquantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.2, p.248–254, 1976.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Aprova o "Regulamento Técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal". **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 set. 2005.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.52, p.302–310, 1978.

BURDGE, G. C., WOOTTON, S. A. Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. **British Journal of Nutrition**, v.88, p.411-420, 2002.

BURDGE, G. C.; JONES, A. E., WOOTTON, S. A. Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of alpha-linolenic acid metabolism in young men. **British Journal of Nutrition**, v.88, p.355-363, 2002.

CAHILL, J. Ethnobotany of chia, *Salvia hispanica* L. (*Lamiaceae*). **Economic Botany**, v.57, p.604–618, 2003.

CALDER, P. C. Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. **European Journal of Pharmacology**, v.668, n.1, p.50-58. 2011.

CALDER, P. C. Very long chain omega-3 (n-3) fatty acids and human health. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.116, p.1280-1300, 2014.

CAPITANI, M. I. et al. Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica L.*) seeds of Argentina. **LWT - Food Science and Technology**, v.45, p.94-102, 2012.

CARNIER et al. Chia (*Salvia hispanica* L.) flour promotes beneficial effects on adipose tissue but not on glycaemic profile of diet-induced obesity in mice. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.119, n.10, 1600384, 2017.

CHEN, Q. et al. Effects of Natural Products on Fructose-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). **Nutrients**, v.9, n.2, pii: E96, 2017.

CHICCO, A. G. et al. Dietary Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) Rich in Alpha-Linolenic Acid Improves Adiposity and Normalises Hypertriacylglycerolaemia and Insulin Resistance in Dyslipaemic Rats, **The British Journal of Nutrition**, v.101, n.1, p.41-50, 2009.

CHOI, J. W. et al. Sugar-Sweetened Soft Drinks, Diet Soft Drinks , and Serum Uric Acid Level : The Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Arthritis & Rheumatism**, v.59, n.1, p.109–116, 2008.

CIFTCI, O. N. et al. Componentes lipídicos de sementes de linho, perilla e chia. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.114, p.794–800, 2012.

COATES W. Whole and ground chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, chia oil—Effects on plasma lipids and fatty acids. In: Preedy V., Watson R.R., Patel V., editors. **Nuts & Seeds in Health and Disease Prevention**. v.1. Academic Press; London, UK: p. 309–315, 2011.

COATES, W.; AYERZA, R. Production potential of chia in northwestern Argentina. **Industrial Crops and Products**, v.5, p.229-233, 1996.

COELHO, S., M.; SALAS-MELLADO, M. M. Chemical characterization of Chia (*Salvia hispanica* L.) for use in food products. **Journal of Food and Nutrition Research**, v.2, p.263-269, 2014.

CRESCENZO, R. et al. Early Effects of a Low Fat, Fructose-Rich Diet on Liver Metabolism, Insulin Signaling, and Oxidative Stress in Young and Adult Rats. **Frontiers in Physiology**, v.9, p.411, 2018.

CREUS, A. et al. Mechanisms Involved in the Improvement of Lipotoxicity and Impaired Lipid Metabolism by Dietary Alpha-Linolenic Acid Rich Salvia Hispanica L (Salba) Seed in the Heart of Dyslipemic Insulin-Resistant Rats. **Journal of Clinical Medicine**, v.5, n.2, pii: E18, 2016.

CUI, X. L., et al. Cyclic AMP stimulates fructose transport in neonatal rat small intestine. **Journal of Nutrition**, v.134, p.1697-703, 2004.

CUPERTINO, M. C. et al. Long-lasting morphofunctional remodelling of liver parenchyma and stroma after a single exposure to low and moderate doses of cadmium in rats. **International Journal of Experimental Pathology**, v.94, n.5, p. 343–351, 2013.

Da SILVA et al. Effects of chia (*Salvia hispanica L.*) on calcium bioavailability and inflammation in Wistar rats. **Food Research International**, v.116, p.592-599, 2018.

Da SILVA et al. Effects of chia (*Salvia hispanica* L.) on oxidative stress and inflammation in ovariectomized adult female *Wistar* rats. **Food & Functional**, v. 10, n.7, p.4036-4045, 2019.

Da SILVA, B., P. et al. Chemical composition of Brazilian chia seeds grown in different places. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1709-1716, 2017.

De MIRANDA et al. Chia flour (*Salvia hispanica* L.) did not improve the deleterious aspects of hyperlipidic diet ingestion on glucose metabolism, butworsened glycaemia in mice. **Food Research International.** v.121, p.641-2019.

DINICOLANTONIO, J., J.; LUCAN, S. C.; O´KEEFE, J. H. The Evidence for Saturated Fat and for Sugar Related to Coronary Heart Disease. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v.58, n.5, p.464-472, 2015.

DUBOIS V., et al. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential, **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.109, n.7, p.710–732, 2007.

ESTERBAUER, H. et al. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Radical Biology and Medicine**, v.13, p.341-390, 1992.

FAN, J., G.; CAO, H., X. Role of diet and nutritional management in non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.28, p.81–87, 2013.

FAO, Fats and oils in human nutrition. Report of a joint expert consultation. Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization, **FAO food and nutrition paper,** v.57, n,i-xix, p.1-147, 1994.

FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, E. et al. Dietary chia seeds (*Salvia hispanica*) improve acute dyslipidemia and steatohepatitis in rats. Journal of food biochemistry, v.43, n.9, e12986, 2019.

FERREIRA, M. S, et al. Dietary Salba (*Salvia Hispanica* L.) Ameliorates the Adipose Tissue Dysfunction of Dyslipemic Insulin - Resistant Rats through Mechanisms Involving Oxidative Stress, Inflammatory Cytokines and Peroxisome Proliferator - Activated Receptor γ. **European Journal of Nutrition**, v.57, n.1, p.83–94, 2016.

FERREIRA, R. T. B. Caracterização nutricional e funcional da farinha de chia (*Salvia hispanica*) e sua aplicação no desenvolvimento de pães. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2013.

FONTE-FARIA, F. et al. Chia oil supplementation changes body composition and activates insulin signaling cascade in skeletal muscle tissue of obese animals. **Nutrition**, v.58, p.167-174, 2019.

FONTELLES, M., J. et al. Metodologia da pesquisa: diretrizes para o cálculo do tamanho da amostra/ Scientific research methodology: guidelines for size sample calculation. **Rev Paran Med**, v.24, p.57-64, 2010.

FORTINO, M., A. et al. Could post-weaning dietary chia seed mitigate the development of dyslipidemia, liver steatosis and altered glucose homeostasis in offspring exposed to a sucrose-rich diet from utero to adulthood? **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.11, p.619–626, 2017.

GONZÁLEZ-MAÑÁN, D.; TAPIAG.; GORMAZ, J.G., et al. Bioconversion of a-linolenic acid to n-3 LCPUFA and expression of PPAR alpha, acyl coenzyme A oxidase 1 and carnitine acyl transferase I are incremented after feeding rats with α-linolenic acid-rich oils. **Food & Function**, v.3, p.765-772, 2012.

GRANCIERI, M., MARTINO, H.,S.,D., De MEJIA, E., G. Digested total protein and protein fractions from chia seed (*Salvia hispanica* L.) had high scavenging capacity and inhibited 5-LOX, COX-1-2, and iNOS enzymes. **Food Chemistry**, v.15, n.289, p.204-214, 2019.

GRANCIERI, M.; MARTINO, H.,S.,D.; De MEJIA, E., G. Chia (*Salvia hispanica* L.) Seed Total Protein and Protein Fractions Digests Reduce Biomarkers of Inflammation and Atherosclerosis in Macrophages In Vitro. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.63, n.19, e1900021, 2019.

GREEN, L.C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochemistry**. v.126, p.131–138, 1982.

GROVER, S., A. et al. Years of life lost and healthy life-years lost from diabetes and cardiovascular disease in overweight and obese people: a modelling study. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v.3, p.114–22, 2015.

HAAN, J. B. et al. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.22528-22536, 1998.

HAFIDI, M., E. et al. “Adipogenesis: A Necessary but Harmful Strategy.” **International journal of molecular sciences**, v.20,15, pii: E3657, 2019.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v.141, p.312-322, 2006.

HARLEY, R. M. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. **Rodriguésia**, v.63 n.1, p.129–144, 2012.

HODGSON, E. K.; FRIDOVICH, I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. **Biochemistry**, v.14, 5294-5299, 1975.

HOWARD, T. D. et al. DNA Methylation in an Enhancer Region of the FADS Cluster Is Associated with FADS Activity in Human Liver. **PLoS One**, v.9, n.5, p. e97510, 2014.

IMAI, H. et al. Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.1990-1997, 1998.

IMTIAZ, F. et al. Neutrophil lymphocyte ratio as a measure of systemic inflammation in prevalent chronic diseases in Asian population. **International Archives of Medicine**, v.5, n.1, 2, 2012.

INNES, J.,K.; CALDER, P.,C. Omega-6 fatty acids and inflammation. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.5, p.41-48, 2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, IV edição 1ª Edição Digital, coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea - São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008 p. 1020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa de orçamentos familiares [Internet] 1996. Disponível em: URL: http://www.ibgw.gov.br/

IXTAINA, V. Y. Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.24, n.2, p.166-174, 2011.

IXTAINA, V. Y.; NOLASCO, S. M.; TOMÁS, M.C. Physical properties of chia (*Salvia hispanica L.)* seeds. **Industrial Crops and Products**, v.28, p.286–293, 2008.

JAACKS, L., M. et al. The obesity transition: stages of the global epidemic. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, n.7, v.3, p.231-240, 2019.

JAHN, D. et al. Animal models of NAFLD from a hepatologist's point of view**. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease**, v.1865, p.943-953, 2019.

JEGATHEESAN, P.; DE BANDT, J. P. Fructose and NAFLD: The multifaceted aspects of fructose metabolism. **Nutrients**, v.9, n.3, p.1–13, 2017.

JENSEN, T. et al. Fructose and Sugar: A Major Mediator of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Journal of Hepatology**, v.68, n.5, p.1063–1075, 2018.

JIN, F. et al. Supplementation of Milled Chia Seeds Increases Plasma ALA and EPA in Postmenopausal Women. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.67, p.105–110, 2012.

JUSTO, M. B. et al. Integral bread development with soybean, chia, linseed, and folic acid as a functional food for women. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.57, n.1, p.78-84, 2007.

KHADGE, S., et al. Dietary omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids modulate hepatic pathology. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.52, p. 92–102, 2018.

KHOSRAVI, M., et al. The effects of oxidative stress on the development of atherosclerosis. **Biological Chemistry**, v.27 n.400, p.711-732, 2019.

KIM, S., J.et al., Dietary fat intake and age modulate the composition of the gut microbiota and colonic inflammation in C57BL/6J mice. **BMC Microbiology**, v.19, p.193, 2019.

KOO, S. H. Nonalcoholic fatty liver disease: Molecular mechanisms for the hepatic steatosis. **Clinical and Molecular Hepatology**, v.19, p.210–215, 2013.

KOZIMOR, A., CHANG, H., COOPER, J. A. Effects of dietary fatty acid composition from a high fat meal on satiety. **Appetite**, v.69, p.39-45, 2013.

KULCZYŃSKI, B. et al. The Chemical Composition and Nutritional Value of Chia Seeds-Current State of Knowledge. **Nutrientes**, v.31 p.11-16, 2019.

LANASPA, M. A. et al. Counteracting roles of AMP deaminase and AMP kinase in the development of fatty liver. **PLoS One**, v.7, n.11, e48801, 2012.

LEE, I., M. et al. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. **Lancet**, v.380, n.9838, p.219-229, 2012.

LENNON, S.; MARTIN, S.; COTTER, T. Dose–dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. **Cell Proliferatio**, v.24, p.203-214, 1991.

LONARDO, A. et al. Hypertension, diabetes, atherosclerosis and NASH: Cause or consequence? **Journal of Hepatology**, v.68, n.2, p.335–352, 2018.

LOPEZ-MIRANDA J.; PEREZ-MARTINEZ P. It is time to define metabolically obese but normal-weight (MONW) individuals. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.79, n.3, p.314–315, 2013.

LYONS, C. L.; KENNEDY, E. B.; ROCHE, H. M. Metabolic Inflammation-Differential Modulation by Dietary Constituents. **Nutrients**, v.8, n.5, 2016.

MARINELI, R. S. et al. Antioxidant Potential of Dietary Chia Seed and Oil (*Salvia hispanica* L.) in Diet-Induced Obese Rats. **Food Research International**, v.76, n.3, p. 666-674, 2015 (a).

MARINELI, R. S. et al. Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v.59, n.2, p.1304–1310, 2014.

MARINELI, R. S. et al. Chia (*Salvia hispanica* L.) enhances HSP, PGC-1α Exprerrions and improves glucose tolerance in diet-induced obese rats. Nutrition, v. 31, n.5, p.740-748, 2015 (b).

MARKLUND, S. L. Product of extracellular-superoxide dismutase catalysis, **FEBS LETTERS**, v.184, n.2, 1985.

MARTIN et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v.19, n.6, p.761-770, 2006.

MARTÍNEZ-CRUZ, O., PAREDES-LÓPEZ, O. Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica L.*) by ultra high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1346, p. 43–48, 2014.

MARTINS, A. P. B. et al. Participação crescente de produtos ultraprocessados na dieta brasileira (1987-2009). **Revista de Saúde Pública**, v.47, n.4, p.656-665, 2013.

MCGARRY, J. D.; FOSTER, D. W. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. **Annual Review of Biochemistry**, v.49, p.395–420, 1980.

MENDEZ-SANCHEZ, N. et al. New aspects of lipotoxicity in nonalcoholic steatohepatitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, n.7, p.2034, 2018.

MENDONÇA, R., D., D. et al. Ultraprocessed food consumption and risk of overweight and obesity: the University of Navarra Follow-Up (SUN) cohort study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.104, n.5, p.1433-1440, 2016.

MEYERS, D. G., MALOLEY, P. A. AND WEEKS, D. Safety of antioxidant vitamins. Arch.Intern. Med. v.156, p.925-935, 1996.

MIQUILENA-COLINA, M. E. et al. Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. **Gut**, v.60, n.10, p.1394-13402, 2011.

MONTEIRO, C. A. et al. Increasing consumption of ultra-processed foods and likely impact on human health: evidence from Brazil. **Public Health Nutrition,** v.14, n.1, p.5-13, 2011.

MONTEIRO, C. A. et al. Ultra-processed products are becoming dominant in the global food system. **Obesity Reviews**, v.14, n.2, p.21–28, 2013.

MONTEIRO, C. A.; CANNON, G. The impact of transnational "big food" companies on the south: A view from Brazil. **PLoS Medicine**, v.9, n.7, e1001252, 2012.

MUÑOZ, L. A. et al. Chia seed (*Salvia hispanica*): an ancient grain and a new functional food. **Food Reviews International**, v.29, n.4, p.394–408, 2013.

MUÑOZ, L. A. et al. Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. **Journal of Food Engineering,** v.108, p.216–224, 2012.

MURPHY, C. M.; STOJEK, M. K.; MACKILLOP, J. Interrelationships among impulsive personality traits , food addiction , and Body Mass Index q. **APPETITE**, v.73, p.45–50, 2014.

MURRIETA, C.M.; HESS, B.W.; RULE, D.C. Comparison of acidic and alkaline catalysts for preparation of fatty acid methyl esters from ovine muscle with emphasis on conjugated linoleic acid. **Meat Science**, v.65, p.523–529, 2003.

NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE. Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults. **National Institute of Health**, 1998.

NELSON, D. L., COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger [recurso eletrônico] / [tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga ... et al.]; revisão técnica: Carlos Termignoni ... [et al.]. – 6. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre: Artmed, 2016.

NG, M.; FLEMING T. et al. Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980-2013: A systematic analysis. **Lancet**, v.384, n.9945, p. 766-781, 2014.

NIEMAN, D. C. et al. Chia seed does not promote weight loss or alter disease risk factors in overweight adults. **Nutrition Research**, v.29, n.6, p.414–418, 2009.

NIEMAN, D. C. et al. Chia seed supplementation and disease risk factors in overweight women: a metabolomics investigation. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**,v.18, n.7, p.700–708, 2012.

NSEIR, W., NASSAR, F., ASSY, N. Soft drinks consumption and nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v.16, p;2579–2588, 2010.

NYBERG, S. T. et al. Obesity and loss of disease-free years owing to major non-communicable diseases: a multicohort study. **The Lancet Public Health**, v.2667, n.3, p. 490-497, 2018.

O'DONNELL, V. B. et al. Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion. Chem. Res. Toxicol. v.12, p.83-92, 1999.

OLIVA, M. E., et al. Dietary Salba (*Salvia hispanica* L) seed rich in alpha-linolenic acid improves adipose tissue dysfunction and the altered skeletal muscle glucose and lipid metabolism in dyslipidemic insulin-resistant rats. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v.89, n.5, p.279–289, 2013.

OLIVEIRA-ALVES, S., C. et al. Characterization of phenolic compounds in chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, fiber flour and oil. **Food Chemistry**, v.1, n.232, p.295-305, 2017.

ORE, A.; AKINLOYE, O., A. Oxidative Stress and Antioxidant Biomarkers in Clinical and Experimental Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, **Medicina**, v.*55*, n.2, pii: E26, 2019.

ORMAZABAL, V. et al. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. **Cardiovascular Diabetology**, v.17, n.1, 122, 2018.

OZER et al. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245, p.194-205, 2008.

PAGLIALUNGA, S.; DEHN, C. A. Clinical assessment of hepatic de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. **Lipids in Health and Disease**, v.15, n.1, p.159, 2016.

PASCHOS, P.; PALETAS, K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. **Hippokratia**, v.13, n.1, p.9–19, 2009.

PATEL, C. et al. Fructose-induced increases in expression of intestinal fructolytic and gluconeogenic genes are regulated by GLUT5 and KHK.

American Journal of Physiology Relatory, Integrative and Comparative Physiology. n.45, p. 499–509, 2015.

PILZ, J.; MEINEKE, I.; GLEITER, C. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2, 4-dinitrophenylhydrazine derivative. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.742, n.2, p.315-325, 2000.

POTI, J., M.; BRAGA, B.; QIN, B. Ultra-processed Food Intake and Obesity: What Really Matters for Health-Processing or Nutrient Content? **Current Obesity Reports**, v.6, p.420–431, 2017.

POUDYAL et al. Effects of ALA, EPA and DHA in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v;24, p.1041–1052, 2013.

POUDYAL, H. et al. Chronic High-Carbohydrate, High-Fat Feeding in Rats Induces Reversible Metabolic, Cardiovascular, and Liver Changes. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v.23, n.2, p.153-162, 2012 (b).

POUDYAL, H. Lipid Redistribution by Alpha-Linolenic Acid-Rich Chia Seed Inhibits Stearoyl-CoA Desaturase-1 and Induces Cardiac and Hepatic Protection in Diet-Induced Obese Rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.23, n.2, p. 153–162, 2012 (a).

PRATT, M. The cost of physical inactivity: moving into the 21st century. **British Journal of Sports Medicine**, v.48, n.3, p.171–173, 2014.

RAHIMI, R. S.; LANDAVERDE, C. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: Clinical implications and treatment. **Nutrition in Clinical Practice**, v.28, n.1, p.40–51, 2013.

RAHMAN, J.; CAMARGO, A. C.; SHAHIDI, F. Phenolic and polyphenolic profiles of chia seeds and their in vitro biological activities. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 622-634, 2017.

RAMAIAH, S. K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, n.9, p.1551-1557, 2007.

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

REYES-CAUDILLO, E., TECANTE, A.; VALDIVIA-LÓPEZ, M. A. Dietary Fibre Content and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Present in Mexican chia (Salvia hispanica L.) Seeds. **Food Chemistry**, v.107, p.656-663, 2008.

RICOULT, S. J. H.; MANNING, B. D. The multifaceted role of mTORC1 in the control of lipid metabolism. **EMBO Reports**, v.14, n.3, p. 242–251, 2013.

RINCÓN-CERVERA, M.; Á. Vegetable oils rich in alpha linolenic acid increment hepatic n-3 LCPUFA, modulating the fatty acid metabolism and antioxidant response in rats. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.11, p.25-35, 2016.

ROGLANS, N. et al. Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPARalpha activity in fructose-fed rats. **Hepatology**, v.45, p.778-788, 2007.

SANDOVAL-OLIVEROS, M. R.; PEREDES-LOPEZ, O. Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica L.*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p.193–201, 2013.

SCHULTE, E. M.; AVENA, N. M.; GEARHARDT, A. N. Which Foods May Be Addictive ? The roles of processing, Fat Content, and Glycemic Load. **Plos One**, v.10, n.2, p.1–18, 2015.

SEGURA-CAMPOS, M. R. et al. Biological potential of chia (*Salvia hispanica L.*) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. **LWT - Food Science and Technology**, v.50, n.2, p.723–731, 2013.

SHIN, S., K.; CHO, H. W.; SONG, S., E.; SONG, D., K. Catalase and nonalcoholic fatty liver disease, **European Journal of Physiology**, v.470, p.1721–1737, 2018.

SHIOMI, T. et al. Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. **Circulation**, v.109, p.544-549, 2004.

SIERRA, L. et al. Dietary intervention with Salvia hispanica (Chia) oil improves vascular function in rabbits under hypercholesterolaemic conditions. **Journal of Functional Foods**, v.14, p.641–649, 2015.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**, v.27, p.916-921, 1999.

SIMOPOULOS, A., P. Omega-6/Omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. **Food Research International**, v.20, p.77-90, 2004.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999.

SOFTIC, S. et al. Role of Dietary Fructose and Hepatic de novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. **Digestive Diseases and Sciences**, **v.**61, n.5, p.1282–1293, 2016.

SPAHIS S. et al. Oxidative Stress as a Critical Factor in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Pathogenesis. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.26, p.519-541, 2017.

SQUADRITO, G. L.; PRYOR, W., A. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. Free Radical Biology and Medicine, v.25, p.392-403, 1998.

STEINMANN, B. et al. Disorders of Fructose Metabolism. In: Scriver, C.Beaudet, A.Sly, W., Valle, D., editors. **The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease**. New York: McGraw-Hill; p. 1489-520, 2001.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiological Reviews**, v.84**,** 1381-1478, 2004.

STORLIEN, L. H. et al. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and ω-3 fatty acids in muscle phospholipid. **Diabetes**, v.40, p.280–289, 1991.

SUÁREZ-CUENCA, J., A. et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and its relation with pro-inflammatory mediators, visceral adiposity and carotid intima-media thickness in population with obesity. **European Journal of Clinical Investigation**, v.49, n.5, e13085, 2019.

TAGA, M. S.; MILLER, E. E.; PRATT, D. E. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.61, n.5, p. 928–931, 1984.

TAKAMURA, et al. Fatty liver as a consequence and cause of insulin resistance: lessons from type 2 diabetic liver. **Endocrine Journal,** v.59, n.9, p.745-763, 2012.

TER HORST, K. W.; SERLIE M. J. Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Nutrients**, v.9, n.9, p.981. 2017.

TOSCANO, L.T. et al. Chia induces clinically discrete weight loss and improves lipid profile only in altered previous values. **Nutrición Hospitalaria**, v.31, n.3, p.1176-1182, 2015.

TUBEROSO, C. et al. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. **Food Chemistry**, v.103, p.1494–1501, 2007.

TURLIN, B. et al. Histologic features of the liver in insulin resistance–associated iron overload. A Study of 139 Patients. **American Journal of Clinical Pathology**, v.116, n.2, p.263-270, 2001.

ULLAH et al. Nutritional and therapeutic perspectives of Chia (Salvia hispanica L.): a review. **Journal of Food Science and Technology**, v.53, n.4, p.1750–1758, 2016.

USDA National Nutrient Database for Standard Reference Release 28. Basic report 12006, seeds, Chia seeds, dried, 2011.

VÁZQUEZ-OVANDO, A. et al. Physicochemical properties of a fibrous fraction from chia (*Salvia hispanica L.*). **LWT - Food Science and Technology**, v.42, p.168–173, 2009.

VÁZQUEZ-OVANdo, J., A. et al. Procesamiento en seco de harina de chía (Salvia hispanica L.): caracterización química de fibra y proteína Dry processing of chía (Salvia hispanica L.) flour: chemical characterization of fiber and protein. **CyTA - Journal of Food**, v.8, p.117-127, 2010.

VUKSAN V. et al. Reduction in postprandial glucose excursion and prolongation of satiety: possible explanation of the long-term effects of whole grain Salba (*Salvia Hispanica L.*). **European Journal of Clinical Nutrition**, v.64, n.4, p. 436–438, 2010.

VUKSAN, V, et al. Salba-Chia (*Salvia Hispanica L.*) in the treatment of overweight and obese patients with type 2 diabetes : A double-blind randomized controlled trial. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.27, p. 138-146, 2017.

VUKSAN, V. et al. Supplementation of Conventional Therapy With the Novel Grain Salba (*Salvia Hispanica L.*) Improves Major and Emerging Cardiovascular Risk Factors in Results of a Randomized Controlled Trial. **Diabetes Care**, v.30, n.11, p.2804–2810, 2007.

WANG B. et al. Prevalence of metabolically healthy obese and metabolically obese but normal weight in adults worldwide: a meta-analysis. **Hormone and Metabolic Research**, v.47, n.11, p.839–845, 2015.

WEBER, C. W.; GENTRY, H. S.; KOHLHEPP, E. A., et al. The nutritional and chemical evaluation of chia seeds. **Ecology of Food and Nutrition**, v.26, p.119–125, 1991.

WOO C., H. et al. Mitochondrial Dysfunction in Adipocytes as a Primary Cause of Adipose Tissue Inflammation. **Diabetes & Metabolism**, v.43, p.247–256, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Fiscal policies for diet and the prevention of noncommunicable diseases. **WHO Regional Office for Europe**, n. 5, p.36, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Joint Consultation: fats and oil in human nutrition. **Nutrition Reviews**. v.53, n.7, p.202-205, 1995.

YOUDIM, K. A., Martin A, Joseph JA. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **International Journal of Developmental Neuroscience,** v.18, n.4-5, p.383-399, 2000.

ANEXO I

Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 89/2018, intitulado "**Efeito da semente e do óleo de chia (*Salvia hispanica L.)* na beta oxidação e lipogênese, no estresse oxidativo e na inflamação hepática em ratos obesos**", coordenada pela professora Hércia Stampini Duarte Martino do Departamento de Nutrição e Saúde, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 21/02/2019, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 89/2018, named **"Effect of seed and chia (Salvia hispanica L.) oil on beta oxidation and lipogenesis, oxidative stress and hepatic inflammation in obese rats"**, is in agreement with the a actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on February 21, 2019 valid for 12 months.

Prof. ª Átima Clemente Alves Zuanon
Presidente
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV